

**M**<sub>2015</sub>

**U. PORTO**



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR  
UNIVERSIDADE DO PORTO

# **ESTUDO E IDENTIFICAÇÃO DE PARASITAS TREMATODA DIGENEA EM CRUSTÁCEOS E GASTRÓPODES DA RIA DE AVEIRO:** caracterização morfológica e molecular

SÓNIA CRISTINA DE BRITO SOARES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA

AO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR

DA UNIVERSIDADE DO PORTO EM

CIÊNCIAS DO MAR – RECURSOS MARINHOS





SÓNIA CRISTINA DE BRITO SOARES

**ESTUDO E IDENTIFICAÇÃO DE PARASITAS TREMATODA  
DIGENEA EM CRUSTÁCEOS E GASTRÓPODES DA RIA DE  
AVEIRO**

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre  
em Ciências do Mar – Recursos Marinhos –  
Especialização em Biologia e Ecologia  
Marinhas submetida ao Instituto de Ciências  
Biomédicas Abel Salazar da Universidade do  
Porto.

Orientador- Pedro Nuno Simões Rodrigues  
Categoria – Professor Associado  
Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas de  
Abel Salazar da Universidade do Porto

Co-orientadora – Susana Maria Rocha Pina  
Categoria – Investigadora Pós-Doutoramento  
Afiliação – Instituto de Biologia Molecular e  
Celular (IBMC)



Aos meus Pais

Irmã

Em especial à Inês

Ao Bruno

“Quando falares, cuida para que as tuas palavras sejam melhores do que o teu silêncio, e lembra-te que alto deve ser o valor das tuas ideias, não o volume da tua voz. Falar sem pensar é disparar sem apontar.”

George Herbert (1593 – 1633)



## Agradecimentos

São poucas as palavras, mas deixo-as com um profundo reconhecido agradecimento. Assim, queria agradecer a todos com quem colaborei, com quem aprendi, não só a tecnologia ou o método, mas a amizade.

Ao meu orientador Professor Pedro Rodrigues, do Laboratório de Sanidade e Imunologia do Departamento da Produção Aquática do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, que me proporcionou esta oportunidade de trabalho, que me assegurou os equipamentos, materiais e reagentes utilizados, e que desde o início depositou em mim a sua confiança. O meu profundo agradecimento pela orientação, apoio e por me ter guiado quando me encontrava perdida no início da minha dissertação.

Expresso aqui o meu sincero agradecimento pela co-orientação e apoio incondicional à Doutora Susana Pina, um exemplo de rigor e de força, que me apoiou durante todo este trabalho. O meu sincero agradecimento pelo exemplo que é como pessoa e cientista. Sem dúvida, um exemplo a seguir.

À Magda Nunes, pelo apoio constante no laboratório e no trabalho de campo. Obrigada pela amizade que foi crescendo, e por me ter ouvido e acalmado nas minhas dúvidas e crises existenciais.

Ao Professor Luís Baldaia, ao Professor Fernando Carvalho, à Professora Mónica Rodrigues e ao Professor António Rocha do Laboratório de Fisiologia Geral do Departamento de Imunofisiologia e Farmacologia deste mesmo Instituto, por todo o apoio e compreensão durante todo o meu percurso académico.

Ao Professor José Fernando Gonçalves e ao Pedro Elói do Laboratório de Engenharia Aquática do Departamento da Produção Aquática deste mesmo Instituto por todo o apoio na manutenção dos caranguejos.

Um agradecimento à amizade, novamente à Susana e Magda, ao Bruno, à Carla e ao Sérgio, por me terem acompanhado durante este percurso, e por terem almoçado tantas vezes a falar sobre parasitas. E sem esquecer também a Francisca, a Catarina e a Ana Rita que me acompanham desde a licenciatura!

O meu sincero agradecimento também, a todo o pessoal da “antiga” parasitologia do Instituto Nacional de Saúde Dr Ricardo Jorge, Porto, nomeadamente à Lurdinhas, ao

André e ao Doutor José Manuel Costa, por tudo o que me ensinaram e que desde sempre me incentivaram a estudar, a saber sempre mais. As saudades são muitas.

Por último, mas tão ou mais importante, à minha família. O meu apoio, a minha âncora à vida. Aos meus pais por todo o apoio, por me terem dado todas as oportunidades que não tiveram, por me terem seguido e incentivado na carreira académica e profissional, a quem faço questão de orgulhar. À minha melhor amiga, a minha irmã que está sempre lá quando eu preciso. Aos meus sobrinhos que crescem tão rápido. Ao meu marido Bruno, por todo o amor e amizade, o apoio e compreensão nas horas infundáveis em que ficava enclausurada a estudar. E claro, o meu profundo agradecimento à minha filha Inês, “filha do mestrado” agora com dois anos, que um dia há-de reconhecer este meu esforço. Obrigada filha por me teres tornado quem sou.

## Resumo

Os tremátodes digenéticos representam cerca de 18.000 espécies que parasitam todas as classes de vertebrados (peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos). A sua característica mais evidente é o seu ciclo de vida, que inclui, pelo menos, duas fases infeciosas, as quais contribuem para o nome Digenea. São responsáveis por patologias que constituem um perigo não só para a saúde humana, mas também para outras espécies de animais, nomeadamente bovinos, ovinos, suínos, equinos e animais domésticos.

Para a correta identificação das espécies, a análise morfológica das diferentes fases larvares, através da microscopia ótica (M.O.) e microscopia eletrónica de varrimento (M.E.V.), deve ser complementada com estudos de biologia molecular.

Neste trabalho, os modelos biológicos estudados foram os caranguejos *Carcinus maenas* e *Polybius henslowii*, e o gastrópode *Nassarius reticulatus*, colhidos no Canal de São Jacinto, Ria de Aveiro, tendo por finalidade a pesquisa de várias fases larvares de parasitas tremátodes digenéticos, por serem hospedeiros intermediários de inúmeras espécies conhecidas.

Após dissecção dos caranguejos, foi possível a observação de metacercárias enquistadas em vários órgãos, em particular o hepatopâncreas e as glândulas antenais. Após o desenquistamento bioquímico das metacercárias, estas foram processadas para M.O. e M.E.V. Os caracteres morfológicos permitiram concluir que as duas espécies de metacercárias isoladas dos caranguejos pertencem à família Microphallidae. Os gastrópodes foram colocados em copos de vidro contendo água da Ria filtrada e arejada, tendo sido sujeitos a ciclos de luz/escuridão. Observou-se a emissão natural de cercárias por *N. reticulatus*, durante alguns dias, as quais foram também processadas para M.O. e M.E.V. Os caracteres morfológicos, nomeadamente cecos digestivos divergentes e longos e cercaria do tipo tricocerca, permitiram concluir que estas pertencem à família Lepocreadiidae. Posteriormente foram aplicadas técnicas de biologia molecular, em particular a amplificação das regiões ITS's do rDNA e respetiva sequenciação. Para tal, procedeu-se à extração de DNA das cercárias e das metacercárias enquistadas, isoladas dos órgãos infetados dos caranguejos.

Concluiu-se então que os caranguejos *Carcinus maenas* e *Polybius henslowii* estavam infetados por *Microphallus primas* e *Gynaecotyla adunca*, respetivamente. Por sua vez, os gastrópodes *N. reticulatus* estavam infetados por *Cercaria setifera*, a fase larvar do adulto *Lepocreadium album*.





## ABSTRACT

The digenetic trematodes represent about 18,000 species that parasitize all classes of vertebrates (fish, amphibians, reptiles, birds and mammals). Its most striking feature is their life cycle, which includes at least two infectious phases, which contribute to the Digenea name. They are responsible for pathologies that constitute a danger not only to human health but also to other animal species, including cattle, sheep, pigs, horses and domestic animals.

Morphological analysis by optical and electron microscopy, must be complemented by molecular analysis, so there are no errors in the classification of the species.

In this work, the biological models studied were the crabs *Carcinus maenas* and *Polybius henslowii* and gastropod *Nassarius reticulatus*, collected at the San Jacinto channel, Ria de Aveiro, with the purpose to research various larval stages of digenetic trematodes parasites, for being intermediate hosts of various known species.

After dissection of crabs, the observation of metacercariae encysted was possible in many organs, particularly the digestive gland and antennal glands. After the biochemical desencystment of metacercariae, these were processed for MO and SEM. The morphological characters showed that the two isolated metacercariae species of crabs belong to Microphallidae family. Gastropods were placed in an aerated glass aquaria filled with filtered seawater from the same localization and kept under a 12/12 hr light/dark regime. We observed the natural emission cercariae by *N. reticulatus*, for a few days, which were also processed for MO and M.E.V. The morphological characteristics, including different digestive cecum and long and encircle the tricocerca type, showed that they belong to the Lepocreadiidae family. Subsequently molecular biology techniques were applied in particular to amplification of regions of ITS's and respective rDNA sequencing. To do this, the procedure was to do the DNA extraction of cercariae and metacercariae encysted, isolated from infected organs of crabs.

It is therefore concluded that the *Carcinus maenas* and *Polybius henslowii* crabs were infected by *Microphallus primas* and *Gynaecotyla adunca* respectively. The gastropods, on the other hand, were infected by *Cercaria setifera*, the larval of *Lepocreadium album*.



## Índice

Índice de figuras .....	III
Índice de tabelas.....	V
Índice de gráficos.....	V
Introdução.....	1
Objetivos.....	4
<b>Capítulo I – OS TREMATODES DIGENÉTICOS: SISTEMÁTICA E BIOLOGIA .....</b>	<b>1</b>
1.Filo Platyhelminthes .....	5
Turbellaria .....	6
Monogenea .....	6
Trematoda.....	7
Cestoda.....	8
1.1.Classe Trematoda .....	9
1.1.1.Subclasse Digenea .....	10
2.Tremátodes Digenéticos .....	14
2.1.Ciclo de vida.....	14
2.2.Morfologia.....	18
2.2.1.Adulto.....	18
2.2.2.Ovo .....	24
2.2.3.Miracídio .....	25
2.2.4.Esporocisto .....	26
2.2.5.Rédia.....	27
2.2.6.Cercária .....	28
2.2.7.Metacercária .....	30
Família Microphallidae.....	32
Família Lepocreadiidae .....	33
<b>Capítulo 2 – PROCEDIMENTOS, MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
1.Hospedeiros intermediários estudados .....	35
1.1.Hospedeiro primário <i>Nassarius reticulatus</i> .....	35
1.2.Hospedeiro intermediário <i>Carcinus maenas</i> .....	36
1.3.Hospedeiro intermediário <i>Polybius henslowii</i> .....	37
2.Local de colheita, Ria de Aveiro, Portugal.....	38
3.Colheita e manutenção dos hospedeiros .....	40
4.Identificação e contagem dos parasitas .....	41
5.Desenquistamento bioquímico das metacercárias .....	43

6.Fixação para microscopia ótica.....	44
6.1.Coloração para microscopia ótica.....	44
7.Fixação para microscopia eletrônica de varrimento .....	45
8.Análise molecular .....	46
8.1.Regões genéticas usadas para inferir relações filogenéticas .....	46
8.2.Extração de DNA.....	47
8.3.Polymerase Chain Reaction (PCR).....	48
8.3.1.Eletroforese em gel .....	49
8.3.2.Purificação dos produtos de PCR.....	49
8.3.3.Sequenciação .....	50
<b>Capítulo 3 - RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
1.Resultados detalhados dos crustáceos.....	51
2.Caracterização da infecção de <i>P. henslowii</i> e <i>C. maenas</i> por Digenea .....	51
Prevalência e intensidade de infestação.....	54
2.1.Caracterização morfológica, ultraestrutural e molecular dos quistos em <i>P. henslowii</i> .....	55
2.1.1.Descrição das metacercárias em microscopia ótica .....	55
2.1.2.Descrição das metacercárias em microscopia eletrônica de varrimento .....	57
2.1.3.Caracterização molecular dos quistos.....	59
2.1.3.1.Amplificação e purificação da região ITS1 do rDNA.....	59
2.1.3.2.Sequenciação .....	60
2.2.Caracterização morfológica, ultraestrutural e molecular dos quistos em <i>C. maenas</i> .....	61
2.2.1.Descrição das metacercárias em microscopia ótica .....	61
2.2.2.Descrição das metacercárias em microscopia eletrônica de varrimento .....	63
2.2.3.Caracterização molecular dos quistos.....	65
2.2.3.1.Amplificação e purificação da região ITS1 do rDNA.....	65
2.2.3.2.Sequenciação .....	66
3.Análise dos gastrópodes amostrados .....	67
3.1.Caracterização morfológica, ultraestrutural e molecular das cercarias em <i>N. reticulatus</i> .....	67
3.1.1.Descrição das cercárias em microscopia ótica .....	67
3.1.2.Descrição das cercárias em microscopia eletrônica de varrimento...68	
3.1.3.Caracterização molecular das cercárias.....	70
3.1.3.1.Amplificação e purificação da região ITS2 do rDNA.....	70
3.1.3.2.Sequenciação .....	71

<b>Capítulo 4 – DISCUSSÃO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO .....</b>	<b>73</b>
Bibliografia.....	77
Links .....	81
Anexo 1 .....	83

## Índice de figuras

---

**Fig.1** - Morfologia de um Turbellaria. a | *Dendrocoelum lacteum* sistema excretor e gastrovascular. b | *Schmidtea* sp. Sistema reprodutor e nervoso.

**Fig.2** - Morfologia de um Monogenea A- *Dactylogyrus squaliobarbi* (ovíparo); B:- *Gyrodactylus pungitii* (vivíparo).

**Fig.3** - Morfologia de um Trematoda, *Eurytrema coelomaticum*.

**Fig.4** - Morfologia de um Cestoda. *Taenia* sp.

**Fig.5** - Esquema do ciclo evolutivo de Digenea

**Fig.6** - Morfologia de um adulto de Digenea (*Clonorchis*, parasita do fígado dos humanos).

**Fig.7** - Morfologia da fase adulta de *Schistosoma mansoni* (Esquistossomose).

**Fig.8** - Diversos tipos de posição e número das ventosas nos Trematoda.

**Fig.9** - Célula flamígera nos Trematoda.

**Fig.10** - Sistema reprodutor masculino nos tremátodes digenéticos.

**Fig.11** - Sistema reprodutor feminino e formação do ovo dos tremátodes digenéticos.

**Fig.12** - Figura demonstrativa das diferentes fases de incubação do miracídio dentro do ovo de *Fasciola gigantica*.

**Fig.13** - Morfologia de miracídio de *Fasciola hepatica*.

**Fig.14** - Esporocisto de *Aporocotylidae* (Digenea).

**Fig.15** - Rédia com cercárias em diferentes fases de desenvolvimento no seu interior.

**Fig.16** - Classificação das cercarias consoante a forma e o tamanho da cauda.

**Fig.17** - Classificação das cercárias consoante a presença de características morfológicas especiais.

**Fig.18** - *Microphallus* sp., A- Metacercária enquistada; B - Metacercária desenquistada coloração H&E.

**Fig.19** - Exemplar de *Nassarius reticulatus*.

**Fig.20** - Exemplar de *Carcinus maenas*.

**Fig.21** - *Carcinus maenas*. A- macho; B- fêmea.

**Fig.22** - Exemplar de *Polybius henslowii*.

**Fig.23** - Local de colheita - São Jacinto (Ria de Aveiro).

**Fig.24** - *N. reticulatus* em tinas de vidro.

**Fig.25** - *C. maenas* dissecado dorsalmente e identificação dos órgãos estudados.

**Fig.26** - Quistos encontrados no hepatopâncreas de *C. maenas*.

**Fig.27** - Genes nucleares do RNA ribossómico que codificam o RNA estrutural dos ribossomas.

**Fig.28** - Metacercária enquistada encontrada no hepatopâncreas de *P. henslowii*.

**Fig.29** - Metacercária desenquistada bioquimicamente (vista ventral).

**Fig.30** - Região médio-posterior da metacercária desenquistada.

**Fig.31** - Ultraestrutura de varrimento da metacercária do hepatopâncreas de *P. henslowii*.

**Fig. 32** - Gel de agarose, amplificação da região ITS1, do rDNA com os *primers* A ITS1 Fw/A ITS1 Rev.

**Fig. 33** - Resultado do *blast* no banco de dados.

**Fig. 34** - Diferentes formas dos quistos isolados do hepatopâncreas de *C. maenas*.

**Fig. 35** - Metacercária desenquistada bioquimicamente dos quistos isolados do hepatopâncreas de *C. maenas*.

**Fig. 36** - Ultraestrutura de varrimento da metacercária extraída do hepatopâncreas de *C. maenas*.

**Fig. 37** - Gel de agarose, amplificação da região ITS1 do rDNA por PCR.

**Fig. 38** - Resultado do *blast* no banco de dados.

**Fig. 39** - Cercaria emitida por *N.reticulatus*.

**Fig. 40** - Pormenor da cauda da cercária. Observação das sedas.

**Fig. 41** - Ultraestrutura de varrimento da cercária emitida por *N. reticulatus*.

**Fig. 42** - Gel de agarose, amplificação da região ITS2 do rDNA com os *primers* 5.8S ITS2 Fw/28S ITS2 Rev.

**Fig. 43** - Resultado do *blast* no banco de dados.

## Índice de Tabelas

---

**Tabela 1** - Classificação de *Nassarius reticulatus*.

**Tabela 2** - Classificação de *Carcinus maenas*.

**Tabela 3** - Classificação de *Polybius henslowii*.

**Tabela 4** - Nº de *P. henslowii* e *C. maenas* dissecados e parasitados, entre Maio e Junho de 2015 na estação 1 da Ria de Aveiro. Nº total de parasitas observados nos diferentes órgãos isolados, valores de prevalência e abundância de infestação.

## Índice de Gráficos

---

**Gráfico 1**- Nº de quistos observados no hepatopâncreas e glândulas antenais de *P. henslowii*.

**Gráfico 2**- Nº de quistos observados no hepatopâncreas de *C. maenas*.

**Gráfico 3**- Nº de quistos observados nas glândulas antenais de *C. maenas*.

**Gráfico 4**- Nº de quistos observados nas brânquias e gónadas de *C. maenas*.

**Gráfico 5**- Distribuição da intensidade média de infestação em *P. henslowii* e *C. maenas*.

**Gráfico 6**- Distribuição da prevalência em *P. henslowii* e *C. maenas*.





## INTRODUÇÃO

---

A parasitologia é um dos ramos mais fascinantes das ciências biológicas que tem como objeto de estudo os parasitas, os seus hospedeiros e as relações entre si.

A existência da maioria dos organismos está dependente de recursos naturais limitados tais como nutrientes, água e locais de reprodução. Estes recursos implicam um investimento, de tempo, energia e risco de predação desse organismo (Barnard and Behnke 1990).

Nenhum ser vivo, sendo ele animal ou vegetal, é capaz de sobreviver e reproduzir-se independentemente do outro e este inter-relacionamento é essencial para a manutenção da vida, e pode variar entre o mutualismo e a predação. Para Neves (2005), o parasitismo terá ocorrido quando na evolução de uma destas associações, um organismo menor se sentiu beneficiado, quer pela proteção, quer pela obtenção de alimento. Nessa evolução surgiram adaptações, principalmente morfológicas, fisiológicas e biológicas, que tornaram o organismo invasor (parasita) cada vez mais dependente do outro ser vivo.

Devido à complexidade das relações parasita-hospedeiro, o conceito de parasitismo é frequentemente mal interpretado. Segundo Clarke (1954), um parasita é um organismo que reside sobre/no interior do corpo de um organismo de maior tamanho, satisfazendo as suas necessidades nutritivas a partir dos seus tecidos. Cheng (1978) definiu o parasitismo como uma relação indispensável entre dois organismos heterospecíficos, durante a qual o parasita, normalmente o mais pequeno entre os dois, depende metabolicamente do hospedeiro, tornando esta relação obrigatória. Uma das mais importantes dependências são os nutrientes que os parasitas conseguem obter diretamente dos hospedeiros. Outro autor (Neves 2005) definiu parasitismo como uma associação entre seres vivos, em que existe unilateralidade de benefícios, sendo um dos associados prejudicado pela associação, o hospedeiro, e o agressor é o parasita. Distinguiu ainda endoparasita, que vive dentro do corpo do hospedeiro, ectoparasita que vive na superfície externa do hospedeiro, e hiperparasita, o que parasita outro parasita, por exemplo, *E. histolytica* sendo parasitado por *Shoerita endogena* (fungo).

Esta estreita relação entre o parasita e o hospedeiro, leva a que este último esteja exposto a substâncias antigénicas de origem parasitária, quer sejam moléculas do corpo do parasita (antigénios somáticos), quer sejam moléculas segregadas ou excretadas por este (antigénios metabólicos), às quais o hospedeiro responde com a produção de anticorpos. Deste modo, o parasitismo, para além de compreender uma dependência

metabólica por parte do parasita, comporta uma resposta imunitária por parte do hospedeiro.

Os trematódes digenéticos são um grupo de endoparasitas responsáveis por diversas patologias em vários tipos de organismos, que constituem um perigo não só para a saúde humana, mas também para outras espécies de animais, nomeadamente bovinos, ovinos, suínos, equinos e animais domésticos. Possuem um ciclo de vida complexo, desenvolvendo a sua primeira fase larvar em moluscos marinhos e, posteriormente, atingem a fase adulta maioritariamente em aves ou peixes, incluindo espécies com elevado valor comercial.

A ideia de que um parasita pode modificar o fenótipo de seu hospedeiro, ou até mesmo alterar a aparência e comportamento do hospedeiro, pode até ter aparecido pela primeira vez em histórias de ficção científica, mas é agora um conceito bem estabelecido no estudo do comportamento animal. Na maioria dos casos conhecidos, estas alterações são muito subtis tanto no comportamento, como na morfologia do hospedeiro. No entanto, em alguns casos essas alterações são evidentes, como os tremátodes que alteram o comportamento dos seus hospedeiros intermediários, ficando mais vulneráveis ao seu predador, o hospedeiro definitivo (Poulin 2010).

Anatomicamente, os tremátodes podem constituir uma quantidade importante na biomassa dos hospedeiros. O nível de danos infligidos é, na maioria das vezes, diretamente proporcional à intensidade da infestação parasitária, bem como ao tipo de larva presente.

Os parasitas podem alterar o equilíbrio das populações dos hospedeiros numa determinada região, bem como a sua representatividade. De entre os efeitos produzidos pela infestação parasitária refere-se a debilidade, deformações e erosão química das conchas, hipertrofia ou atrofia dos tecidos do hospedeiro, que favorecem a deteção e a predação pelo hospedeiro definitivo; o aumento do consumo de oxigénio e da taxa de metabolismo, como alterações na resposta do hospedeiro ao “*stress*” ambiental; e até mesmo a morte do hospedeiro nos casos de infestações violentas (Lauckner 1987).

O potencial de reprodução pode também ser influenciado por “castração parasitária”, afetando também desta forma a nutrição, o crescimento e o comportamento do hospedeiro.

“Um conhecimento mais profundo dos ciclos de vida permitirá o uso mais inteligente e efetivo duma metodologia que permita uma redução da mortalidade, um avanço da saúde e a conservação dos recursos naturais” (Lauckner 1987).

Um exemplo disso, a sobreexploração e a má gestão da pesca, causam enorme impacto no meio ambiente, por capturas indiscriminadas de recursos piscícolas que podem levar à rutura dos *stocks*, constituindo uma ameaça à extinção das espécies, e também a poluição por hidrocarbonetos oriundos dos tanques de gasolina dos navios. Desta forma, tem havido uma necessidade crescente na produção de peixes, crustáceos e bivalves em condições de cativeiro. Porém, as pisciculturas são um local privilegiado para a ocorrência de parasitoses, uma vez que os hospedeiros intermediários (peixes/moluscos) e finais (aves/peixes) podem ocorrer em grandes densidades numa área restrita, favorecendo assim as infeções por digenéticos. Assim sendo, as diferentes fases dos ciclos de vida destes tremátodes interferem, a vários níveis, com diferentes organismos pertencentes à cadeia alimentar marinha, o que vai contribuir para o decréscimo da produtividade nessas explorações (Lauckner 1987).

Relativamente aos ciclos dos tremátodes digenéticos, comparativamente ao vasto número de cercárias e adultos descritos, poucos ciclos de vida foram resolvidos experimentalmente. Até à utilização das técnicas moleculares, muitos ciclos de vida foram inferidos, muitas vezes completamente injustificados e incluindo erros grosseiros, puramente baseados em observações morfológicas similares entre os estados larvares e adulto, o que resulta em dados confusos e incorretos. Desta forma, a utilização das técnicas de biologia molecular vieram complementar os dados morfológicos, e comparar filogeneticamente diferentes estádios dos ciclos de vida dos tremátodes digenéticos.

## OBJECTIVOS

---

Nesta tese, após uma revisão de conhecimentos atuais sobre os parasitas digenéticos, e de uma breve descrição do local de estudo e dos hospedeiros utilizados como modelo biológico, o gastrópode *Nassarius reticulatus*, e os caranguejos *Polybius henslowii*, e *Carcinus maenas*, procedeu-se a um levantamento dos parasitas tremátodes digenéticos presentes nestes hospedeiros intermediários, assim como uma abordagem de outras espécies passíveis de serem hospedeiros, de forma a completar os ciclos de vida destes parasitas no Canal de São Jacinto. Para tal, foram realizados estudos periódicos baseados em microscopia ótica e microscopia eletrónica de varrimento, bem como o uso de técnicas moleculares. Os resultados obtidos foram devidamente analisados e comparados com estudos anteriores, de modo a alcançar os objetivos propostos.

## CAPÍTULO 1 - OS TREMÁTODES DIGENÉTICOS: SISTEMÁTICA E BIOLOGIA

---

### 1. Filo Platyhelminthes

---

O filo Platyhelminthes representa um vasto e diverso grupo de organismos, na sua maioria parasitas obrigatórios (incapazes de sobreviver sem o hospedeiro), que parasitam inúmeras espécies de vertebrados e invertebrados. Como o próprio nome sugere (platy = chato; helminta = verme), são animais achatados dorso-ventralmente, desprovidos de segmentação, acelomados ou então com lacunas reduzidas, designadas por esquizocelios. Não possuem esqueleto, e os sistemas circulatório e respiratório não se encontram diferenciados. O sistema estrutural e funcional que possuem para a sua osmorregulação/excreção designa-se por protonefrídeo, também designado por células flama. O sistema digestivo é caracterizado pela ausência de ânus, e a maioria dos parasitas são hermafroditas. A epiderme, revestida de cílios externos, é substituída por uma cutícula na sua forma adulta. Este filo inclui cerca de 30.000 espécies e apresenta uma diversidade extraordinária em morfologia, habitats, ciclos de vida, de estratégias de vida e tamanho, variando desde seres microscópios a seres com vários metros de comprimento (Hickman et al. 2012, Goater et al. 2014).

A sua sistemática apresenta inúmeras controvérsias, principalmente no que diz respeito à origem e inter-relação da maioria dos grupos parasitários. A história evolutiva deste filo permanece confusa acerca da sua morfologia, fisiologia, ciclos de vida, e também por existirem poucos fósseis devido ao seu corpo mole. Porém, nas últimas duas décadas, e principalmente devido à utilização de marcadores moleculares e microscopia eletrónica, a sua sistemática sofreu significativas alterações.

De acordo com a literatura (Matthews 1998, Hickman et al. 2012, Goater et al. 2014), o filo Platyhelminthes está dividido em 4 classes:

Turbellaria, representada, na sua maioria, por formas de vida livre, de corpo achatado revestido com uma epiderme ciliada. Possuem uma camada muscular subjacente à epiderme que se subdivide em músculos circulares e longitudinais, que lhes permite torcer e virar o corpo. São animais acelomados, com sistema digestivo simples e sistema nervoso difuso em forma de rede. Possuem células especializadas na função fotorrecetora, os ocelos. Habitam ambientes aquáticos, principalmente marinhos ou ambientes terrestres muito húmidos. A reprodução pode ser feita de forma assexuada por bipartição longitudinal, ou sexuada por fecundação cruzada (Fig.1). Exemplo: *Dugesia* (Planaria), *Microstomum*, *Planocera*.

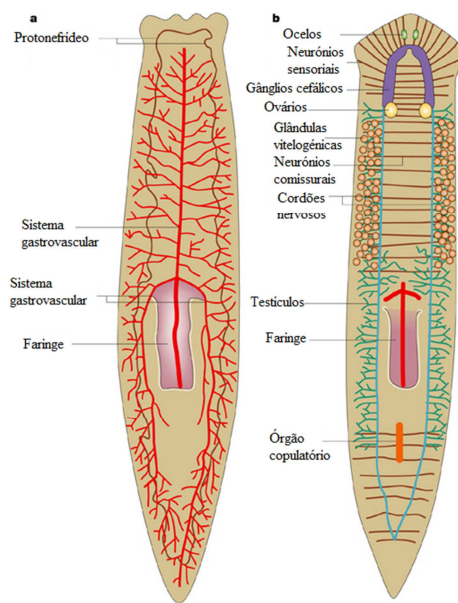


Fig. 1 Morfologia de um Turbellaria. a | *Dendrocoelum lacteum* sistema excretor e gastrovascular. b | *Schmidtea sp.* Sistema reprodutor e nervoso. Adaptado de Newmark and Alvarado 2002.

Monogenea, representada maioritariamente por ectoparasitas de vertebrados aquáticos, encontrados nas superfícies externas do hospedeiro como, por exemplo, na pele ou brânquias de peixe. Possuem ciclos de vida simples com apenas um hospedeiro, e um sistema de órgãos de fixação que lhes permite a respetiva adesão. Constituem um grave problema em aquacultura, pois pelo facto de terem apenas um único hospedeiro (por exemplo o peixe) podem proliferar rapidamente, causando *stress* elevado e por fim a morte. Incluem principalmente duas grandes famílias: Dactylogyridae e Gyrodactylidae, que diferem nas estratégias reprodutivas e no modo de adesão ao hospedeiro. Os girodactílídeos são vivíparos e os indivíduos dessa família são, na sua maioria, parasitas do tegumento, podendo ocorrer também nas brânquias. Por sua vez, os dactilogirídeos são ovíparos, e quase sempre são encontrados nas brânquias, podendo alojar-se também nas cavidades nasais e, mais raramente, noutras partes do corpo (Fig.2).

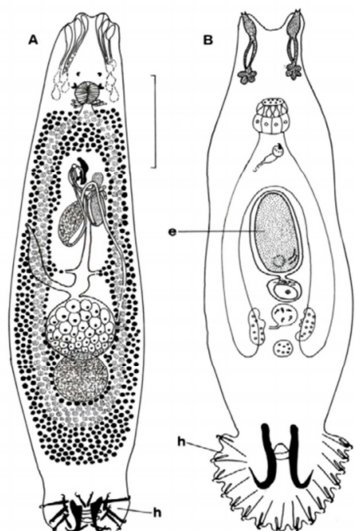


Fig. 2- Morfologia de um Monogenea A-*Dactylogyrus squaliobarbi* (ovíparo); B:-*Gyrodactylus pungitii* (vivíparo). e- embrião, h- haptor . Fonte: <http://www.esciencecentral.org/journals/OCNimages/2332-2632-2-117-g005.html>

Trematoda, representada por endoparasitas, em que o ciclo de vida possui pelo menos dois hospedeiros intermediários. Possuem forma típica foliácea e a reprodução normalmente é cruzada, mas pode ocorrer autofecundação. Os adultos não possuem epiderme e cílios externos; o corpo é não-segmentado, revestido por uma cutícula. Inclui duas subclasses, Aspidogastrea e Digenea. Exemplo: *Eurytrema coelomaticum* (Fig.3), *Fasciola*, *Clonorchis*.

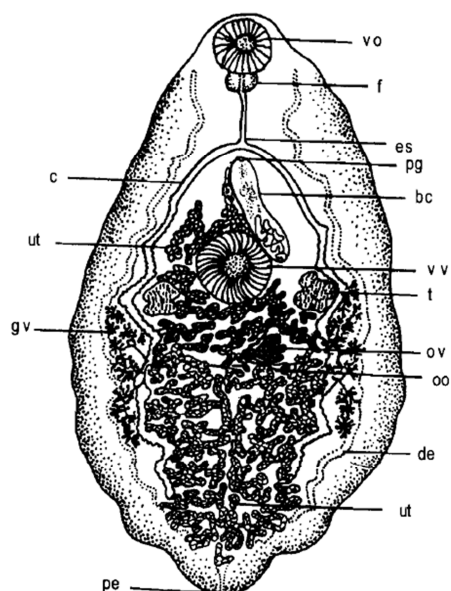


Fig. 3- Morfologia de um Trematoda, *Eurytrema coelomaticum*, Vo-ventosa oral; f-faringe; es-esófago; c-ceco; pg-poro genital; bc-bolsa do cirro; vv-ventosa ventral; t-testículo; ov-ovário; oo-oótipo circundado pelas glândulas de Mehlis; de-ducto excretor; pe-poro excretor; gv-glândulas vitelárias; ut-útero (cheio de ovos). (Neves 2005)

Cestoda, representada apenas por animais endoparasitas. Não possuem boca nem nenhuma outra estrutura do sistema digestivo: o alimento é incorporado pela superfície do corpo dos animais. São hermafroditas, com corpo geralmente alongado em forma de fita, segmentado, cada segmento chamado de proglótide, onde se encontram os órgãos reprodutores masculino e feminino. Exemplo: *Taenia* (Fig.4), *Diphyllobothrium*, *Hymenolepis*.

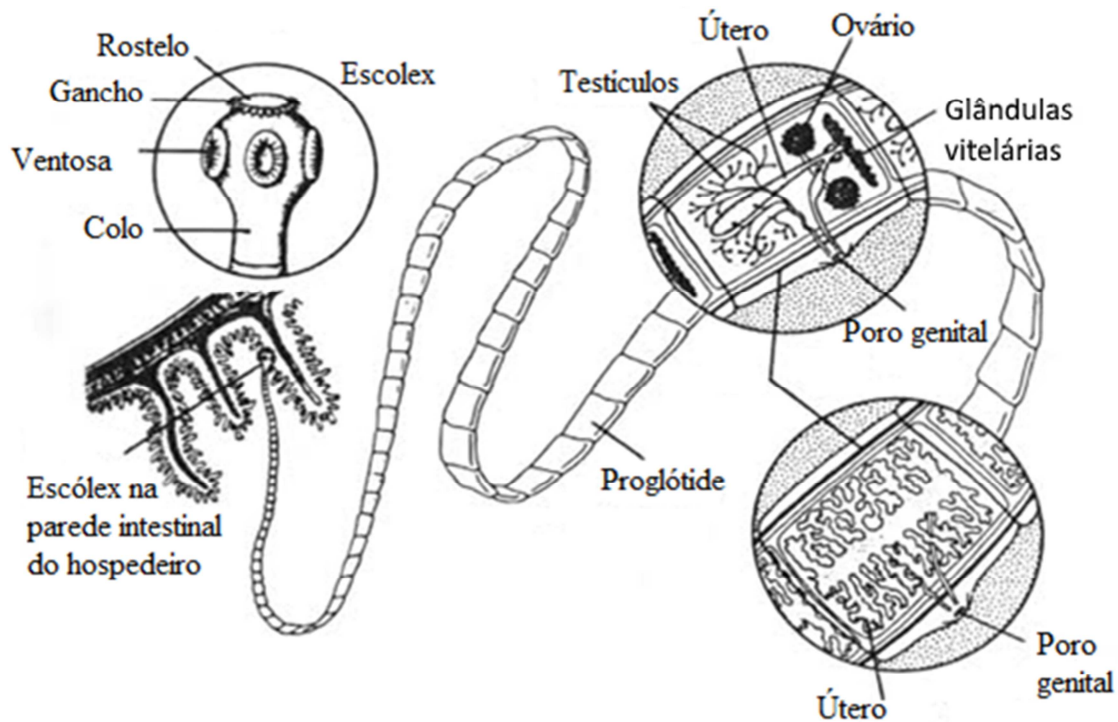


Fig. 4- Morfologia de um Cestoda. *Taenia* sp. Fonte: <http://www.bioscripts.net/zoowiki/temas/6B.html>



### 1.1. Classe Trematoda, Rudolphi 1808

Trematoda Rudolphi, 1808 é uma classe pertencente ao filo Platyhelminthes que compreende duas subclasses, Aspidogastrea Faust & Tang, 1936 e Digenea Carus, 1863. As espécies destes parasitas ocorrem numa vasta variedade de ambientes, sendo a maioria endoparasitas. A fase larvar pode ocorrer tanto em hospedeiros invertebrados, especialmente moluscos, como em vertebrados, enquanto que a sua fase adulta parasita maioritariamente hospedeiros vertebrados. O seu tamanho pode variar entre 0.2 mm e 6.0 cm, e normalmente a sua cor varia com o que é assimilado na alimentação do hospedeiro. O seu sistema digestivo está bem desenvolvido, e uma característica desta classe são as adaptações que foram sofrendo ao longo da sua evolução, nomeadamente a presença de glândulas de penetração, e órgãos de adesão (ventosas) anteriores e/ou posteriores. A ventosa oral ou anterior fica situada na extremidade anterior da face ventral, e é terminal ou subterminal. A subclasse Digenea compreende um grande e diverso grupo, com cerca de 18.000 espécies, muitas delas de elevada importância médica e económica (Smyth and Wakelin 1994, Hickman et al. 2012, Toledo and Fried 2014).

### 1.1.1. Subclasse Digenea Van Beneden, 1858

A subclasse Digenea compreende cerca de 2.500 gêneros e 18.000 espécies, e assim representa o mais diversificado grupo de endoparasitas Platyhelminthes (Toledo and Fried 2014).

Os tremátodes digenéticos parasitam todas as classes de vertebrados (peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos), estando descritas numerosas espécies para hospedeiros marinhos e dulciaquícolas. A sua característica mais evidente é o seu ciclo de vida, que inclui, pelo menos, duas fases infeciosas, as quais contribuem para o nome Digenea. Assim sendo, pelo menos dois hospedeiros são infetados antes que o ciclo de vida se complete. O primeiro hospedeiro intermediário é tipicamente um molusco, o segundo hospedeiro intermediário pode ser um invertebrado (anelídeo, crustáceo, molusco, entre outros) ou um vertebrado (peixe) e o hospedeiro definitivo, o qual completa o ciclo, é um vertebrado (peixe, ave ou mamífero).

A sua morfologia, os seus ciclos de vida, e fundamentalmente a análise molecular têm sido as bases para poder classificar esta subclasse em Ordem, Superfamília e Família. Segundo Olson et al. (2003), a subclasse Digenea está subdividida em:

#### ❖ Subclasse Digenea

- Ordem Echinostomida
  - ◆ Superfamília Echinostomoidea
    - Família Atractotrematidae, p.e. *Atractotrema sigani*
    - Família Echinostomatidae, p.e. *Echinostoma revolutum*
    - Família Fasciolidae, p.e. *Fasciola hepatica*
    - Família Haploporidae, p.e. *Hapladena nasonis*
    - Família Haplospilichnidae, p.e. *Hymenocotta mulli*
    - Família Philophthalmidae, p.e. *Cloacitrema narrabeenensis*
    - Família Psilostomidae, p.e. *Psilochasmus oxyurus*
  - ◆ SuperFamília Heronimoidea
    - Família Heronimidae, p.e. *Heronimus mollis*
  - ◆ SuperFamília Paramphistomoidea
    - Família Cladorchiidae, p.e. *Solenorchis travassosi*
    - Família Diplodiscidae, p.e. *Diplodiscus subclavatus*
  - ◆ SuperFamília Pronocephaloidea
    - Família Labicolidae, p.e. *Labicola cf. elongata*

- Família Notocotylidae, p.e. *Catatropis indicus*
  - Família Opisthotrematidae, p.e. *Lankatrema mannarensense*
  - Família Pronocephalidae, p.e. *Macrovestibulum obtusicaudum*
  - Família Rhabdiopoeidae, p.e. *Rhabdiopoeus taylori*
- ♦ SuperFamília Microscaphidioidea
  - Família Mesometridae, p.e. *Mesometra* sp.
  - Família Microscaphidiidae, p.e. *Hexangium* sp.
- Ordem Plagiorchiida
  - ♦ SuperFamília Allocreadioidea
    - Família Opecoelidae, p.e. *Gaevskajatrema halosauropsi*
    - Família Opistholebetidae, p.e. *Maculifer* sp.
  - ♦ SuperFamília Lepocreadioidea
    - Família Acanthocolpidae, p.e. *Cableia pudica*
    - Família Apocreadiidae, p.e. *Homalometron armatum*
    - Família Brachycladiidae, p.e. *Zalophotrema hepaticum*
    - Família Enenteridae, p.e. *Enenterum aureum*
    - Família Gorgocephalidae, p.e. *Gorgocephalus kyphosi*
    - Família Gyliauchenidae, p.e. *Paragyliauchen arusettae*
    - Família Lepocreadiidae, p.e. *Preptetos caballeroi*
  - ♦ SuperFamília Microphalloidea
    - Família Microphallidae, p.e. *Microphallus primas*
  - ♦ SuperFamília Opisthorchioidea
    - Família Cryptogonimidae, p.e. *Caecicola parvulus*
    - Família Heterophyidae, p.e. *Cryptocotyle lingua*
    - Família Opisthorchiidae, p.e. *Amphimerus ovalis*
  - ♦ SuperFamília Plagiorchioidea
    - Família Auridistomidae, p.e. *Auridistomum chelydrae*
    - Família Brachycoeliidae, p.e. *Brachycoelium salamandrae*
    - Família Cephalogonimidae, p.e. *Cephalogonimus retusus*
    - Família Choanocotylidae, p.e. *Choanocotyle hobbsi*
    - Família Dicrocoeliidae, p.e. *Brachylecithum lobatum*
    - Família Encyclometridae, p.e. *Encyclometra colubrimurorum*
    - Família Gorgoderidae, p.e. *Degeneria halosauri*
    - Família Lecithodendriidae, p.e. *Lecithodendrium linstowi*
    - Família Macroderoididae, p.e. *Macroderoides typicus*
    - Família Omphalometridae, p.e. *Rubenstrema exasperatum*

- Família Pachypsolidae, p.e. *Pachypsolus irroratus*
- Família Plagiorchiidae, p.e. *Haematoloechus longiplexus*
- Família Pleurogenidae, p.e. *Pleurogenes claviger*
- Família Prosthogonimidae, p.e. *Prosthogonimus ovatus*
- Família Telorchiidae, p.e. *Opisthioglyphe ranae*
- ♦ SuperFamília Renicoloidea
  - Família Renicolidae, *Renicola* sp.
- ♦ SuperFamília Troglotrematoidea
  - Família Orchipedidae, p.e. *Orchipedum tracheicola*
  - Família Paragonimidae, p.e. *Paragonimus iloktsuenensis*
  - Família Troglotrematidae, p.e. *Nanophyetus salminicola*
- ♦ SuperFamília Zoogonoidea
  - Família Faustulidae, p.e. *Antorchis pomacanthi*
  - Família Lissorchiidae, p.e. *Lissorchis kritskyi*
  - Família Monorchiidae, p.e. *Ancylocoelium typicum*
  - Família Zoogonidae, p.e. *Deretrema nahaense*
- Ordem Strigeida
  - ♦ SuperFamília Azygioidea
    - Família Azygiidae, p.e. *Otodistomum cestoides*
  - ♦ SuperFamília Bivesiculoidea
    - Família Bivesiculidae, p.e. *Bivesicula claviformis*
  - ♦ SuperFamília Brachylaimoidea
    - Família Brachylaimidae, p.e. *Brachylaima* sp.
    - Família Leucochloridiidae, p.e. *Leucochloridium perturbatum*
  - ♦ SuperFamília Bucephaloidea
    - Família Bucephalidae, p.e. *Prosorhynchoides gracilescens*
  - ♦ SuperFamília Clinostomoidea
    - Família Clinostomidae, p.e. *Clinostomum* sp.
  - ♦ SuperFamília Cyclocoeloidea
    - Família Cyclocoelidae, p.e. *Cyclocoelum mutabile*
    - Família Eucotylidae, p.e. *Tanaisia fedtschenkoi*
  - ♦ SuperFamília Diplostomoidea
    - Família Diplostomidae, p.e. *Alaria alata*
    - Família Strigeidae, p.e. *Apharyngostrigea cornu*
  - ♦ SuperFamília Gymnophalloidea
    - Família Callodistomidae, p.e. *Prosthenhystera obesa*

- Família Fellodistomidae, p.e. *Fellodistomum fellis*
- Família Tandanicolidae, p.e. *Prosogonarium angelae*
- ◆ SuperFamília Hemiuroidea
  - Família Accacoeliidae, p.e. *Accacoelium contortum*
  - Família Derogenidae, p.e. *Derogenes varicus*
  - Família Didymozoidae, p.e. Unidentified *didymozoid* sp.
  - Família Hemiuridae, p.e. *Dinurus longisinus*
  - Família Lecithasteridae, p.e. *Lecithaster gibbosus*
  - Família Sclerodistomidae, p.e. *Prosogonotrema bilabiatum*
  - Família Syncoeliidae, p.e. *Copiatestes filiferus*
- ◆ SuperFamília Schistosomatoidea
  - Família Sanguinicolidae, p.e. *Aporocotyle spinosicanalis*
  - Família Schistosomatidae, p.e. *Schistosoma mansoni*
  - Família Spirorchidae, p.e. *Spirorchis scripta*
- ◆ SuperFamília Transversotrematoidea
  - Família Transversotrematidae, p.e. *Crusziella formosa*

## 2. Tremátodes Digenéticos

### 2.1.Ciclo de vida

Antes de descrever o ciclo de vida destes parasitas, é essencial uma breve definição dos hospedeiros envolvidos nas diversas fases do ciclo:

*Primeiro hospedeiro intermediário* - espécie, normalmente um invertebrado, na qual se desenvolve a fase de esporocisto e/ou rédia, e onde se efetua o desenvolvimento da larva denominada cercária;

*Segundo hospedeiro intermediário* – invertebrado ou vertebrado, no qual tem lugar o desenvolvimento da cercária em metacercária. Este hospedeiro faz parte da cadeia alimentar do hospedeiro definitivo;

*Hospedeiro definitivo* – organismo vertebrado em que o parasita desenvolve a fase adulta.

Os tremátodes possuem ciclos de vida complexos, envolvendo dois a quatro hospedeiros, com gerações completamente distintas na morfologia e forma de os infetar. Em todos os ciclos conhecidos, o parasita madura em hospedeiros como humanos, anfíbios, répteis, peixes ou aves, e utilizam invertebrados, principalmente das zonas interditais como hospedeiros intermediários (Cribb 1998).

Dado que eles atravessam estádios distintos durante os seus ciclos de vida, é aconselhável estudar a morfologia de cada geração, e entender o seu ciclo de vida.

Na figura 5 pode-se observar o ciclo de vida, de uma forma generalizada dos trematodes digenéticos. No intestino do hospedeiro definitivo encontra-se a fase adulta do parasita, a fusão dos gametas, feminino e masculino, resulta no zigoto, envolvido por uma cápsula. Estes ovos, geralmente numerosos, atravessam o lúmen intestinal, saindo para o exterior através das fezes do hospedeiro. Ao entrar em contacto com a água, os ovos eclodem e sai do seu interior um miracídio, larva livre e nadadora. Este miracídio penetra o tegumento de um primeiro hospedeiro intermediário, perdendo, neste processo, a epiderme ciliada. Por metamorfose, dá origem a um esporocisto ou rédia, o qual migra através dos vasos sanguíneos, tecidos e outros órgãos, alojando-se preferencialmente na glândula digestiva. Nalgumas espécies, os ovos infetam de uma forma passiva o hospedeiro, ao serem ingeridos (Cheng 1978).

Além da glândula digestiva, já foi constatada a presença do esporocisto nas gónadas, manto, espaços linfáticos que rodeiam o intestino, brânquias, entre outros. Uma vez estabelecida a localização, o esporocisto desenvolve-se para uma forma mais madura. No seu interior existem células germinativas, que através de divisões mitóticas vão-se desenvolver e diferenciar-se, formando então a geração larvar seguinte, a rédia. Tanto na fase de esporocisto como na fase de rédia, cada um deles pode ter varias gerações, como por exemplo esporocisto (ou rédia) de segunda geração. As células germinativas continuam a desenvolver-se, formando a cercária. A cercária, forma livre e nadadora, abandona este primeiro hospedeiro intermediário e penetra no interior de um segundo hospedeiro intermediário, onde se vai enquistar, recebendo o nome de metacercária. Nalgumas espécies, as cercárias infetam um novo hospedeiro ao serem ingeridas, podendo também enquistar no meio ambiente. O hospedeiro definitivo consome então o segundo hospedeiro intermediário, e a metacercária vai-se desenquistar no intestino, após passagem pelos sucos gástricos do estômago, e gradualmente transforma-se no adulto.

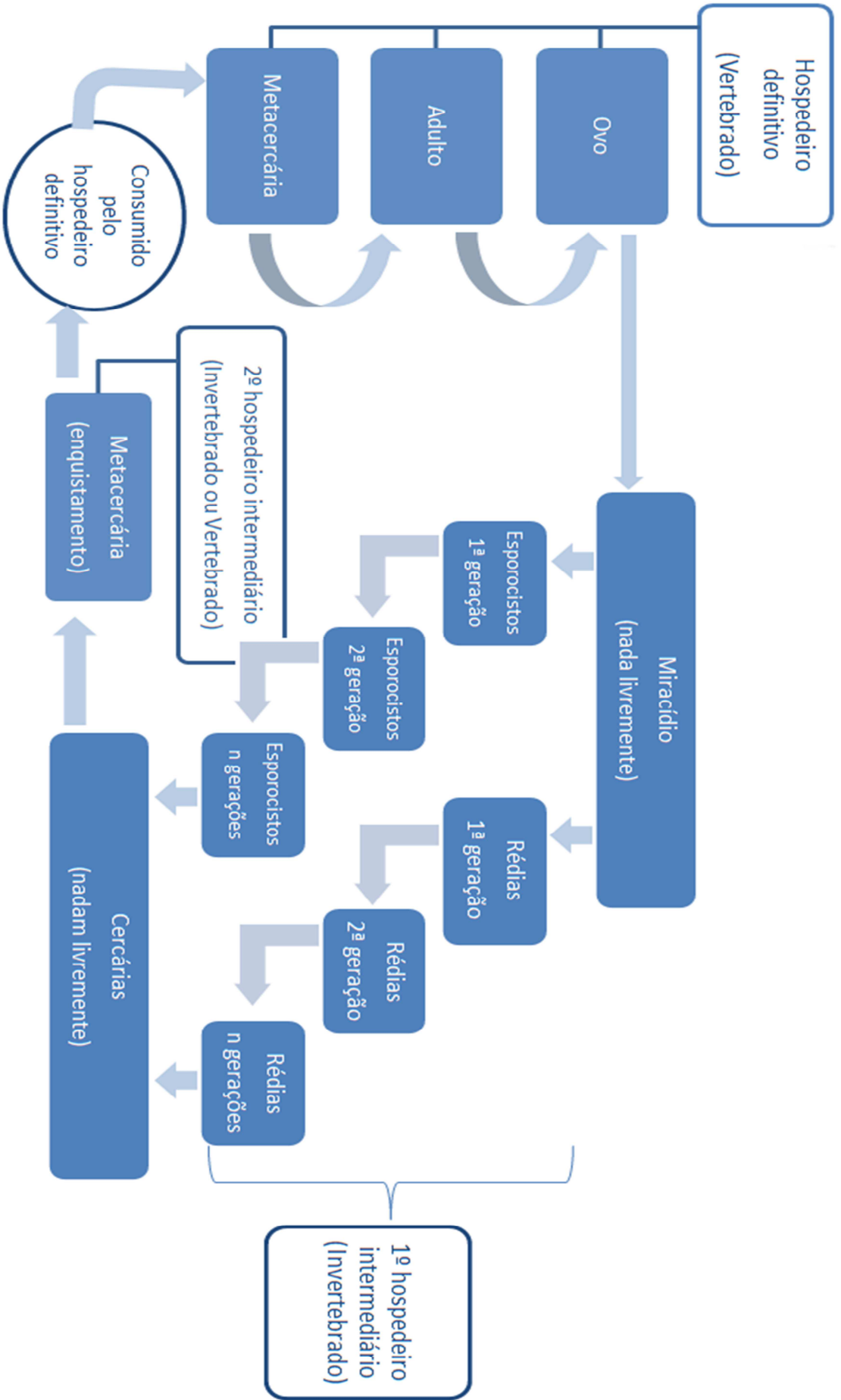


Fig. 5- Esquema do ciclo evolutivo de Digenea adaptado de Storer (1982).



Podem-se verificar algumas exceções ao ciclo geral de vida acima descrito, nomeadamente a supressão de um dos hospedeiros, tornando desta forma o ciclo mais curto, o que corresponde, na maioria dos casos, a uma estratégia de sobrevivência. Temos como exemplos:

- A utilização do primeiro hospedeiro intermediário também como segundo hospedeiro intermediário;
- A utilização do segundo hospedeiro intermediário também como hospedeiro definitivo;
- O desenvolvimento do parasita adulto no interior de esporocistos e rédias, no primeiro hospedeiro intermediário, assim como a produção de ovos dos quais eclodem miracídios;
- A ingestão passiva do miracídio, por vez da sua penetração ativa no hospedeiro;
- O enquistamento das cercárias em diversas superfícies, plantas ou substratos, em vez do enquistamento no interior de outro hospedeiro;
- A supressão do estado de metacercária e desenvolvimento direto da cercária em adulto.
- A inclusão de mais um hospedeiro intermediário para a fase de mesocercária, fase compreendida entre a cercária e a metacercária.

## 2.2.Morfologia

### 2.2.1. Adulto

Os tremátodes digenéticos na sua fase adulta são achatados ventralmente, convexos dorsalmente, apresentando frequentemente a forma de folha ou alongados (Figs 6 e 7).

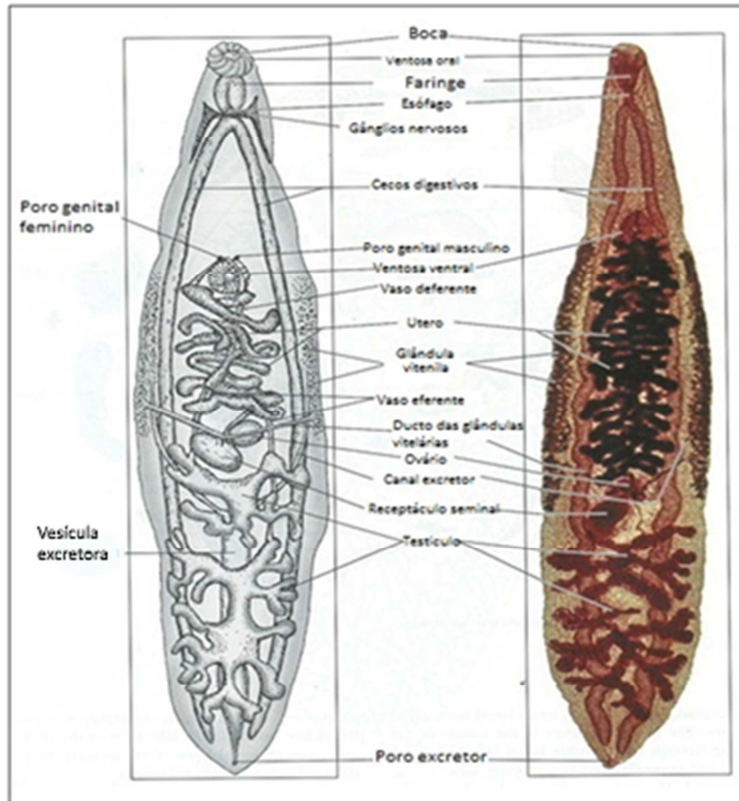


Fig. 6- Morfologia de um adulto de Digenea (*Clonorchis*, parasita do fígado dos humanos) Fonte: <http://quizlet.com/4259287/lab-ch-89-flash-cards/>

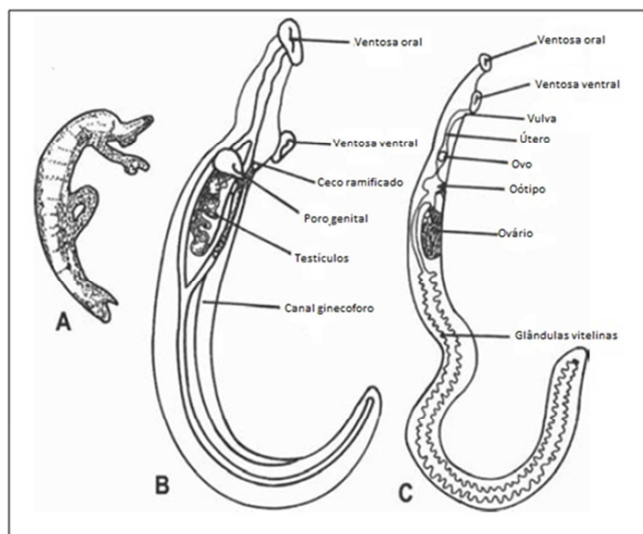


Fig. 7- Morfologia da fase adulta de *Schistosoma mansoni* (Esquistossomose) ; A- cópula; B - Macho; C – Fêmea (Neves 2005)

O seu tamanho pode variar entre os 0.2 mm e os 6.0 cm (Hickman, 2007). A boca é rodeada por uma musculosa ventosa oral, na parte anterior, que tem como função a adesão ao hospedeiro e auxílio no transporte de alimento para o interior da boca. Quando contraída, permite a aderência do organismo ao seu suporte. Além desta, possuem o acetabulum, uma ventosa ventral, situada sensivelmente na linha média ventral. Certas espécies possuem apenas uma ventosa, e noutras, que vivem em cavidades fechadas, as ventosas podem ser muito rudimentares ou então nem existirem, como se verifica nos Sanguinicolidae, parasitas sanguíneos. Outras espécies, como *Bucephalus* spp., possuem tentáculos invagináveis a rodear a ventosa anterior (Eiras, 1994).

Devido a esta variedade no número e posição das ventosas, existem diferentes denominações entre os digenéticos (Fig.8):

- Monostómios: presença ou ausência de ventosa oral na parte anterior do corpo, e ausência de acetabulum;
- Anfistómios: ventosa oral e acetabulum situados, respetivamente, nas extremidades anterior e posterior do indivíduo;
- Gasterostómios: presença única de uma ventosa oral, situada na parte mediana ventral;
- Distómios: acetabulum próximo da ventosa oral, na região anterior do corpo;

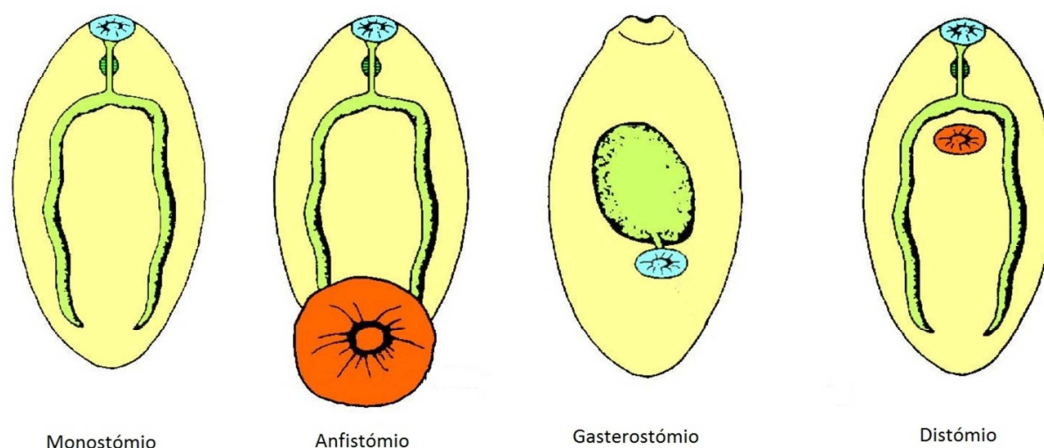


Fig. 8- Diversos tipos de posição e número das ventosas nos Trematoda  
 Fonte: <http://med.mui.ac.ir/slide/parasitology/parasitology32.jpg>

O corpo é revestido por um sincício citoplasmático desprovido de cílios – o tegumento – que se sobrepõe a camadas musculares. Pode conter espículas, tipo

escamas, uni ou multidigitadas, inseridas em pequenos alvéolos, ou pode ser enrugado, variando com a espécie. É através do tegumento que se difundem os resíduos de azoto, e onde se efetuam as trocas gasosas. O tegumento, assim como o intestino, absorvem glucose e alguns aminoácidos (Hickman, 2004).

O aparelho digestivo é fechado e bem desenvolvido. Inicia-se na boca, seguida de uma pré faringe, uma faringe muscular e um curto esófago, que se bifurca em dois sacos cegos – os cecos digestivos – com ou sem divertículos, estendendo-se ao longo da região posterior do corpo.

O sistema excretor é protonefridial (*proto* - primeiro + *nephros* – rim), um sistema de osmorregulação e excreção primitivo, baseado em células flamígeras (Fig. 9), as quais estão localizadas entre as células parenquimatosas. Unem-se por finos túbulos a túbulos coletores de maiores dimensões, situados longitudinalmente, que se unem e vão desembocar numa vesícula excretora, situada na região posterior do corpo, que se abre para o exterior através do nefridiópore.

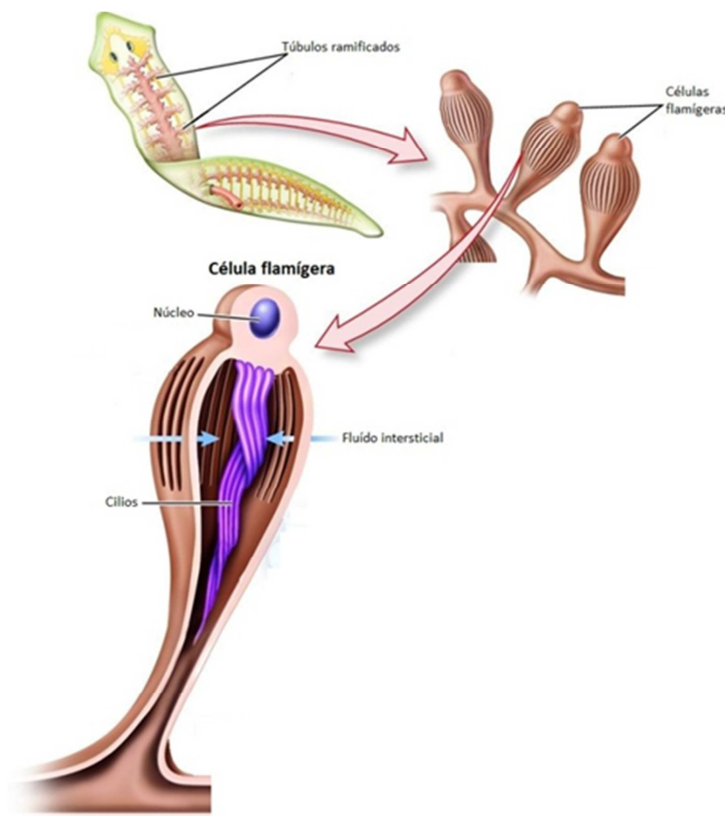


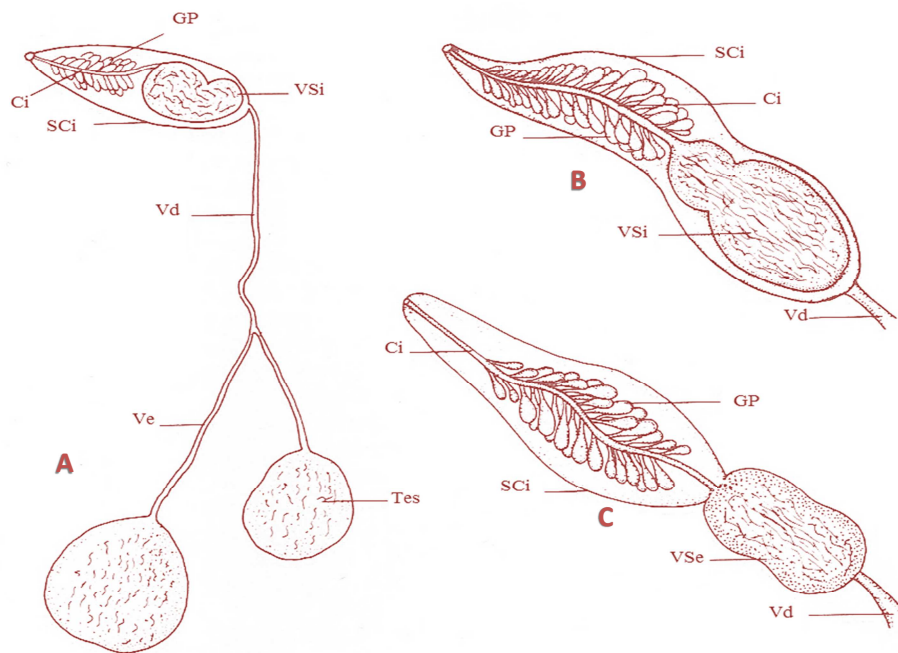
Fig. 9- Célula flamígera nos Trematoda Fonte: <http://biology-forums.com/index.php?action=gallery;sa=view;id=1272>

Quanto à respiração, os tremátodes digenéticos são anaeróbios facultativos. No seu meio natural, estes parasitas estão sujeitos a variações de quantidade de oxigénio. Sem órgãos respiratórios especializados, o principal método de libertação de energia é a glicólise anaeróbica, que produz óxido de carbono e ácidos orgânicos. A quantidade de oxigénio utilizada varia com a sua localização no hospedeiro, e também com o estágio de desenvolvimento do parasita.

O sistema nervoso é constituído por um par de gânglios cerebrais anteriores, a partir dos quais se alongam posteriormente cordões nervosos longitudinais. A superfície do corpo apresenta também uma diversidade de papilas sensoriais, formadas por estruturas bulbosas providas de um orifício central, de onde poderá emergir um cílio. Os órgãos sensoriais são essenciais para o reconhecimento do substrato, do micro-habitat no hospedeiro, proximidade de alimento bem como de substâncias prejudiciais, e percepção de alterações das condições ambientais.

Relativamente ao sistema reprodutor, os digenéticos são geralmente hermafroditas (excluindo os membros da família Schistosomatidae), e algumas espécies possuem a capacidade de auto fertilização, não sendo esse o método preferencial, mas sim a fertilização cruzada. Os parasitas na sua fase adulta reconhecem-se através de feromonas.

A parte masculina do sistema reprodutor (Fig. 10) é constituída, geralmente, por dois testículos. Porém, existem espécies apenas com um testículo, e outras multitesticulares (Toledo and Fried, 2014). A forma e localização dos testículos também varia consoante a espécie, sendo um caracter de extrema importância para a identificação das espécies. De cada testículo surge um vaso eferente, que se vai unir a um ducto comum, formando o vaso deferente, o qual é conduzido até uma estrutura sacular, a bolsa do cirro – órgão copulatório. Em algumas espécies, os vasos eferentes penetram independentemente neste órgão, sem formarem o vaso deferente. Esta bolsa possui uma forma de saco, e localiza-se no extremo terminal do aparelho reprodutor masculino, e no seu interior encontra-se a vesícula seminal, glândulas próstáticas e um ducto ejaculatório, o qual se projeta num átrio genital comum. Nalgumas espécies, a vesícula seminal localiza-se fora da bolsa do cirro, recebendo o nome de vesícula seminal externa. Os espermatozoides formados nos testículos são conduzidos através dos vasos eferente e deferente até à vesícula seminal, onde vão ser armazenados temporariamente. Durante a cópula, o esperma é ejaculado pelo cirro que se vai inserir no átrio genital do aparelho reprodutor feminino.



**Fig. 10- Sistema reprodutor masculino nos trematódes digenéticos. A- estrutura completa; B- saco do cirro nas espécies com vesícula seminal interna; C- porção terminal das espécies com vesícula seminal externa. Ci- cirro; GP- glândulas da próstata; SCi- saco do cirro; Tes- testículo; Ve- vaso eferente; Vd- vaso deferente; VSe- vesícula seminal externa; VSi- vesícula seminal interna. Adaptado de Cheng (1978).**

O sistema reprodutor feminino (Fig. 11) inclui, geralmente, um único ovário localizado anterior ou posteriormente aos testículos, dependendo da espécie. Os óvulos – ovócitos secundários- formam-se no interior do ovário, que comunica com o oótipo através do oviduto. Perto do seu local de abertura, o oviduto (ciliado) recebe um ducto do receptáculo seminal (estrutura alargada e bulbosa, descrita como o órgão feminino que armazena os espermatozoides) e um ducto comum – ducto vitelino- das glândulas vitelárias direita e esquerda, geralmente localizadas na parte lateral do corpo. Algumas espécies possuem também uma região conhecida como reservatório vitelino, que está localizado entre o ducto vitelino e o oviduto.

Outras estruturas estão também ligadas ao oótipo, como por exemplo as glândulas de Mehlis, compostas por células glandulares unicelulares que se ligam independentemente ao oótipo, e cuja função se baseia principalmente na formação da cápsula do ovo e lubrificação do útero, pelo que facilita a sua passagem. O útero é um túbulo longo e por vezes curvilíneo que sai do oótipo, e se prolonga anteriormente até ao átrio genital e gonoporo. Na sua parte terminal, a parede é muscular e funciona como

uma câmara recetora do órgão copulador masculino (Cheng, 1978; Toledo and Fried, 2014).

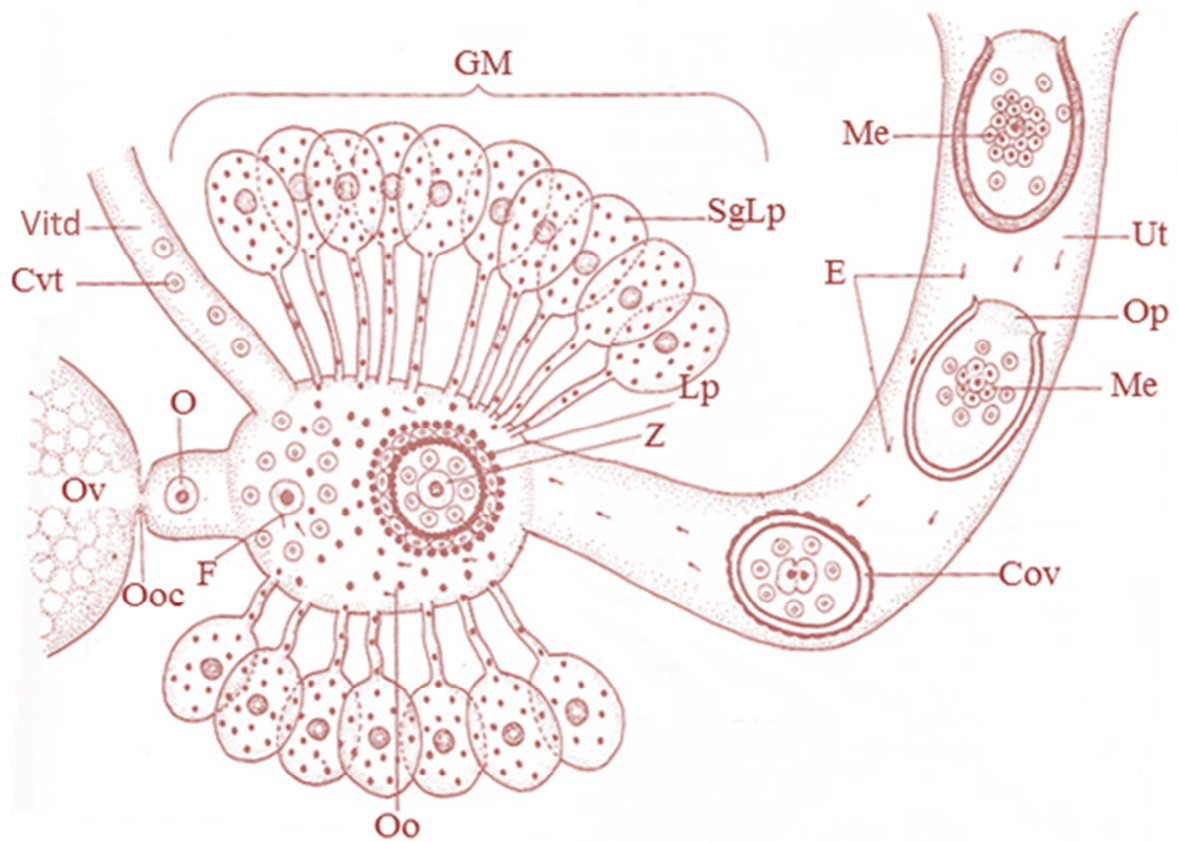


Fig. 11- Esquema do sistema reprodutor feminino e formação do ovo nos tremátodes digenéticos. Cov- casca do ovo; Cvt- célula vitelínica; E- espermatozoides; F- fecundação; GM- glândulas de Mehlis; Lp- lipoproteína; Me- miracídio embrionário; O- óvulo; Oo- oótipo; Ooc- oocapto; Op- opérculo; Ov- ovário; Vitd- viteloducto; SgLp- secreção de gotas de lipoproteína; Ut- útero; Z- zigoto. Adaptado de Cheng (1978).



### 2.2.2. Ovo

A estrutura referente ao ovo, nos tremátodes, não se refere ao óvulo em desenvolvimento. Trata-se de uma cápsula que tem no seu interior uma forma embrionária, o miracídio. Na maioria das espécies, o ovo possui numa das extremidades o opérculo, por onde mais tarde o embrião se irá libertar através da ação enzimática (Cheng, 1978). O seu tamanho pode variar entre 18  $\mu\text{m}$  a 150  $\mu\text{m}$  de comprimento, consoante as espécies. A sua forma também varia, podendo ser esférico, alongado ou ovoide, sendo esta última a mais comum. Os ovos que se desenvolvem no útero do parasita adulto, são expelidos através do poro genital para o lúmen do intestino do hospedeiro definitivo, saindo para o exterior juntamente com as fezes. Pode também ocorrer a libertação do parasita ainda cheio de ovos para o exterior do hospedeiro. A primeira divisão de cada ovo dá origem à célula somática e à célula germinal. As células somáticas darão origem ao corpo do parasita, e as germinais serão as células reprodutivas (Ruppert and Barnes, 1994) (Fig.12).

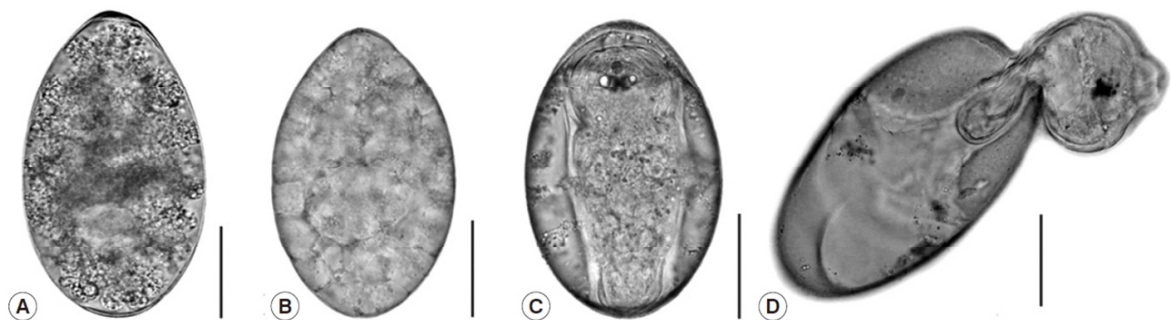


Fig. 12- Figura demonstrativa das diferentes fases de incubação do miracídio dentro do ovo de *Fasciola gigantica*. A- Ovo não embrionado; B - Ovo embrionado; C - Ovo com miracídio desenvolvido; D - Miracídio a libertar-se do ovo. (Phalee et al., 2015).



### 2.2.3. Miracídio

O miracídio é a forma larvar que se desenvolve no interior do ovo, e vai eclodir quando este entra em contacto com a água. Tem forma de vida livre, nadadora, ciliada e de pequeno tamanho (aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ ), e é revestido por lâminas epidérmicas ciliadas, em que a sua disposição tem um grande valor para a determinação de relações filogenéticas. Por baixo das lâminas epidérmicas encontram-se os músculos longitudinais e circulares, bem desenvolvidos (Cheng, 1978).

No extremo anterior do miracídio, encontra-se uma papila apical móvel, onde estão situados 4 filamentos conectados a células nervosas, que por sua vez, se ligam a um gânglio cerebral. Quanto a órgãos sensitivos podem existir duas, por vezes três manchas oculares e papilas laterais, uma em cada lado do corpo.

O miracídio (Fig.13) tem um período de vida curto até atingir um novo hospedeiro, e encontra-o por quimiotactismo. Ao penetrar o tegumento do hospedeiro, perde a epiderme ciliada e migra, através da corrente sanguínea ou tecidos, geralmente até à glândula digestiva. Uma vez atingido o seu microbiótopo, o miracídio sofre metamorfose e transforma-se numa estrutura em forma de saco, o esporocisto (Toledo and Fried, 2014).

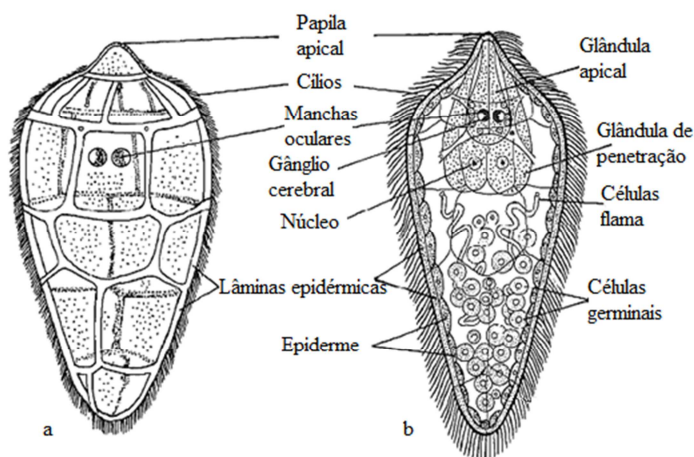


Fig. 13 - Morfologia do miracídio de *Fasciola hepatica*

Fonte: [http://www.expertsmind.com/CMSImages/1508\\_Miracidium%20larva.png](http://www.expertsmind.com/CMSImages/1508_Miracidium%20larva.png)

#### 2.2.4. Esporocisto

Os esporocistos (Fig.14) são estruturas semelhantes a um “saco”, que se formam imediatamente após a transformação do miracídio, depois da sua penetração no hospedeiro. São estruturas maioritariamente encontradas nas glândulas digestivas, gónadas e brânquias do primeiro hospedeiro intermediário, um molusco. A sua forma varia de ovoide a um saco alargado em forma de bastonete, ou então apresenta estruturas ramificadas, as quais são características das famílias Bucephalidae, Heronimidae, Brachylaimidae e Dicrocoeliidae, e que se podem estender pelos tecidos do hospedeiro. No seu interior existe um espaço denominado “câmara de incubação”, onde se formam as células germinais, e cada uma delas divide-se assexuada e repetidamente, dando origem a uma geração de esporocistos filhos que, por sua vez, podem originar várias gerações de esporocistos. Nalgumas espécies, o esporocisto possui um poro genital de onde saem as larvas da geração seguinte (cercárias). Nas espécies que não possuem esse poro genital, as larvas saem através da ruptura da parede do esporocisto.

Dependendo da espécie, o esporocisto mãe desenvolve-se em esporocisto filho, ou pode desenvolver-se em rédias ou em cercárias.



Fig. 14 – Esporocisto de *Aporocotylidae* (Digenea) (Hechinger, 2012).

### 2.2.5. Rédia

Tal como anteriormente referido, o desenvolvimento das células germinais em esporocistos filhos ou rédias é dependente da espécie. A rédia (Fig.15) diferencia-se do esporocisto pela existência de uma boca localizada na extremidade anterior, que se comunica com a faringe bem desenvolvida. São mais ativas do que os esporocistos, e são capazes de movimentar-se através de contrações do seu corpo, migrando assim entre os tecidos e alimentando-se de células do hospedeiro. Em algumas espécies, a boca encontra-se rodeada por papilas sensoriais, e usam a faringe musculosa para bombear alimento para o intestino (Fried and Graczyk, 1997).

No seu interior, na câmara de incubação, existem células germinativas que se irão diferenciar, formando as cercárias, ou rédias filhas.

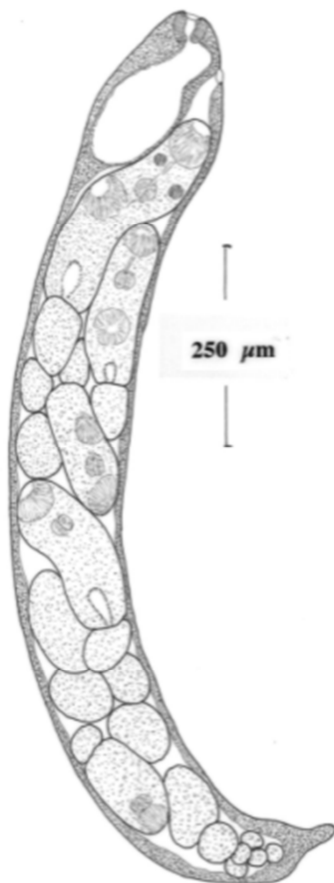


Fig. 15 - Rédia com cercárias em diferentes fases de desenvolvimento e células germinativas no seu interior (Bartoli and Gibson, 1998).

### 2.2.6. Cercária

As cercárias resultam de várias gerações de esporocistos e /ou rédias, que dão origem a estas larvas. Depois de abandonarem a câmara de incubação, as cercárias saem do hospedeiro e podem, consoante a espécie, agir das seguintes formas:

- transformam-se em organismos livres que nadam até encontrarem um novo hospedeiro; penetram nos seus tecidos e desenvolvem-se em metacercárias, enquistando-se ou não;
- enquistam-se ao entrar em contacto com uma superfície;

É de salientar que as cercárias, sendo uma fase lavar livre e nadadora, tem um tempo de vida curto (cerca de 24h). Na sua maioria, as cercárias têm uma forma foliácea, sendo achatadas dorsoventralmente. A sua morfologia é já um esboço da fase adulta, e nesta fase é possível observar as ventosas oral e ventral. Possuem glândulas epiteliais tegumentares pré-acetabulares, como cistogénicas, associadas à formação da parede do futuro quisto, e cefálicas de penetração, contribuindo para a saída da cercária do esporocisto e do hospedeiro, e para a penetração de um novo hospedeiro intermediário. Possuem também glândulas pós acetabulares que segregam substâncias intervenientes na sua adesão ao substrato ou ao hospedeiro. Consoante a espécie, algumas cercárias possuem também cílios à superfície, presumivelmente com funções sensoriais, assim como formações tegumentares em forma de espinhos, cuja abundância e distribuição também varia com a espécie, e que se supõe estarem igualmente relacionadas com a sua aderência aos tecidos dos hospedeiros (Eiras, 1994).

Apesar da maioria das cercárias serem nadadoras ativas, por possuírem uma cauda muscular situada na região posterior do corpo, algumas rastejam ao longo de um substrato, e outras nunca chegam a deixar o hospedeiro primário (Fried and Graczyk, 1997).

Existem diferentes tipos de cercárias atendendo à sua morfologia externa, podendo ser classificadas consoante o número e posição das ventosas, tal como na fase adulta, a forma e tamanho da cauda (1), a presença de características morfológicas especiais (2). Podem ser classificadas por (Cheng 1978):

(1) - Pleurolofocerca: Caracterizada pela presença de uma prega localizada dorsoventralmente, que se estende por todo o comprimento da cauda (Fig. 16 A).

- Cisticerca: cauda longa e espessa com a extremidade pontiaguda (Fig. 16 B).

- Furcocerca: caracteriza-se por uma cauda bifurcada (Fig. 16 C).

- Microcerca: caracteriza-se por uma cauda pequena, que pode ser larga ou cônica (Fig. 16 D).

- Gimnofalla: caracteriza-se pela ausência de cauda (Fig. 16 E).

- Ropalocerca: caracteriza-se pela largura da cauda, tão grande ou mais que o próprio corpo (Fig. 16 F).

- Leptocerca: com uma cauda reta delgada, mais estreita que o corpo.

- Tricocerca: caracteriza-se pela presença de espinhos ou sedas na cauda (Fig. 16 G).

- Cercariae: assemelha-se à gimnofalla, sem cauda, porém quando abandonam o hospedeiro, deslocam-se com movimentos vermiformes (Fig. 16 H).

- Rat-King: caracterizam-se por apresentar uma distribuição em colónia, isto porque as caudas de indivíduos distintos unem-se e os corpos movimentam-se radialmente (Fig. 16 I).

- Cotilocerca: similar à microcerca, porém a sua curta cauda apresenta uma forma côncava (Fig. 16 J).

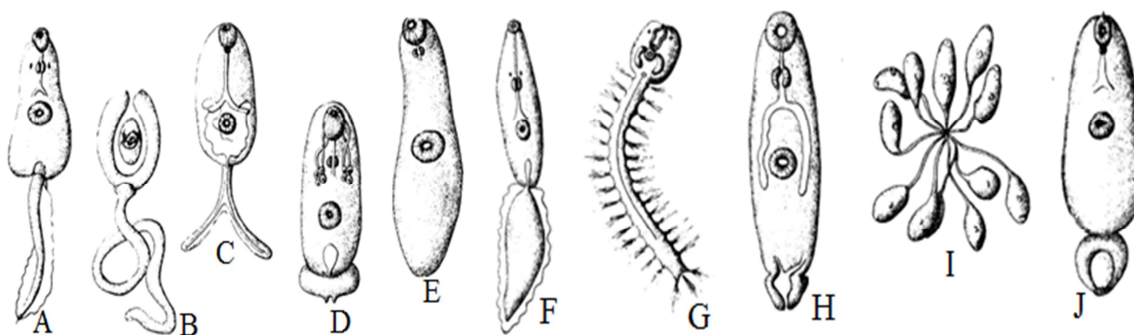


Fig. 16 - Classificação das cercárias consoante a forma e o tamanho da cauda (Cheng, 1978).

(2) - Equinostoma: caracteriza-se pela presença de um colar de espinhos a rodear a ventosa oral. (Fig. 17 A)

- Gimnocefala: extremidade anterior arredondada (Fig. 17 B)

- Xifidiocercaria: extremidade anterior com estilete (Fig. 17 C)

- Oftalmocercaria: com manchas oculares.

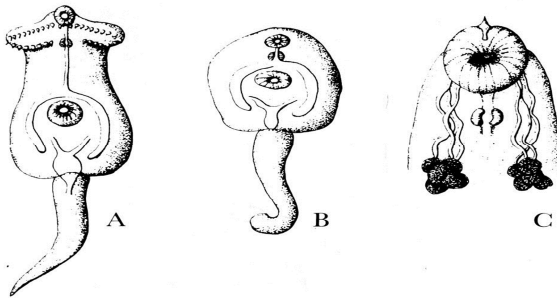


Fig. 17- Classificação das cercárias consoante a presença de características morfológicas especiais. (Cheng, 1978)

#### 2.2.7. Metacercária

Este estágio de desenvolvimento é atingido logo que a cercária, após penetrar o hospedeiro intermediário, perde a cauda e enquistam. Antes de ocorrer o enquistamento, a cercária aumenta a sua atividade. As suas ventosas prendem-se a um hospedeiro ou substrato, e a cauda desprende-se do corpo. É então libertado material cistogénico, através das glândulas cistogénicas, para a formação do quisto, cuja forma, número de camadas e composição química é variável consoante a espécie (Fig.18 A).

Nalguns casos, as cercárias penetram no hospedeiro intermediário e transformam-se, mas não enquistam, sendo consideradas metacercárias livres (ex.: *Leucochloridiomorpha constantiae*, *Meiogymnophallus minutus*). Noutros casos, as cercárias enquistam sobre animais, sobre a vegetação ou sobre outras superfícies tais como conchas, rochas, entre outros (ex.: *Diphtherostomum brusinae*, *Himasthla quissetensis*, *Labratrema minimum*, *Fasciola hepatica*, *Zygocotyle lunata*, *Philophthalmus hegeneri*).

A metacercária é uma réplica do adulto, iniciando-se a maturação das gónadas, embora estas não estejam ainda funcionais (Fig.18 B). Permanece no hospedeiro intermediário, enquistada ou não, até que este seja ingerido por um vertebrado, o hospedeiro definitivo. No interior deste desenquista, e migra para o órgão que vai



constituir o seu micro-habitat, onde se vai fixar com a ajuda de estruturas, tais como ventosas e espinhos, e onde vai permanecer até atingir a fase adulta, caracterizada pela atrofia da vesícula excretora e pelo desenvolvimento de um aparelho sexual hermafrodita.

Na opinião de alguns autores, este estágio de metacercária no ciclo de vida dos digenéticos, é normalmente visto como um estágio de repouso em que o parasita causa pouco ou nenhum dano ao hospedeiro. Este ponto de vista está completamente errado, uma vez que é do interesse do parasita induzir alterações no comportamento ou debilitar o hospedeiro, de forma a que este se torne numa presa fácil para o hospedeiro definitivo, infectando-o, e atingindo assim o seu principal objetivo que é completar o seu ciclo de vida (Lauckner, 1987).

Algumas metacercárias enquistadas (ex.: *Posthodiplostomum nanum* e *Clinostomum tilapiae*) apresentam apenas uma única camada de origem parasitária, não possuindo nenhuma cápsula originada pelo hospedeiro. Nalgumas espécies, o hospedeiro contribui com substâncias para a parede do quisto (ex.: colagénio em *E. trivolvis*, fibroblastos em *Ornithodiplostomum ptychocheilus* e melanina em *Uvulifer ambloplitis*) (Fried and Graczyk, 1997).

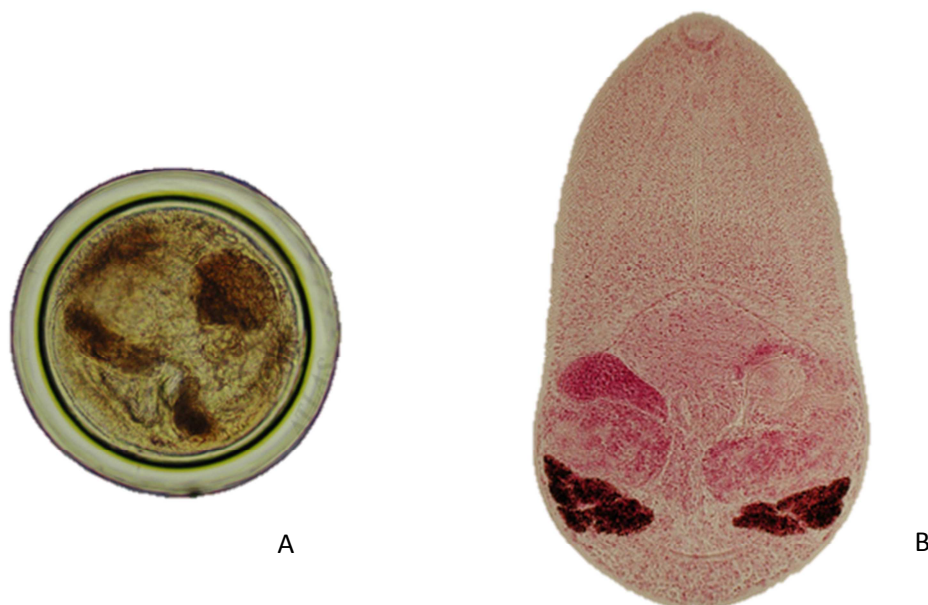


Fig. 18- *Microphallus* sp. A- Metacercária enquistada; B - Metacercária desenquistada coloração H&E  
Fonte: [http://www.atlas.or.kr/atlas/alphabet\\_view.php?my\\_codeName](http://www.atlas.or.kr/atlas/alphabet_view.php?my_codeName)

### Família Microphallidae Travassos, 1920

A família Microphallidae pertence à ordem Plagiorchiiformes La Rue, 1957 e à subordem Plagiorchiata La Rue, 1957, em que o adulto parasita o intestino de vertebrados, principalmente aves e mamíferos. O seu ciclo de vida envolve também gastrópodes aquáticos como primeiros hospedeiros intermediários e crustáceos como segundos hospedeiros intermediários.

Os ovos dos parasitas desta família são pequenos, os quais serão ingeridos pelo primeiro hospedeiro intermediário, no interior do qual eclodem dando origem a duas gerações de esporocistos. As cercárias geralmente apresentam manchas oculares, e são providas de um estilete anterior (oftalmoxifidiocercaria); não possuem cauda bifurcada nem canais excretores no seu interior. As cercárias necessitam de um segundo hospedeiro intermediário para enquistar.

As principais características desta família são: corpo pequeno e piriforme, coberto por espinhos; presença de pré faringe, faringe e esófago, cecos digestivos curtos e bastante divergentes, ventosa ventral pequena situada na metade posterior do corpo, testículos simetricamente opostos ou dispostos ligeiramente na diagonal, pós acetabulares; vesícula seminal pré ou pós acetabular; órgão copulador masculino bem desenvolvido; um ovário pré-testicular; glândulas vitelárias dispostas em grupos simétricos; vesícula excretora em forma de “V” (Heard, 1969; Brooks, 1989).



### Família Lepocreadiidae Odhner, 1905

A família Lepocreadiidae pertence à ordem Plagiorchiida La Rue, 1957 e à subordem Lepocreadiata Olson, Cribb, Tkach, Bray & Littlewood, 2003. O adulto normalmente parasita o intestino de peixes teleósteos marinhos. O primeiro hospedeiro intermediário, usualmente gastrópodes, ingerem os ovos, normalmente operculados, que vão eclodir e originar esporocistos mãe que se irão diferenciar em rédias. As cercárias vão enquistar num segundo hospedeiro intermediário que pode ser um organismo invertebrado ou vertebrado (peixe).

As principais características desta família são: corpo alongado, tegumento revestido de espinhos, os quais estão ocasionalmente presentes na ventosa oral; presença de manchas oculares que podem perdurar até à fase adulta. Presença de ventosa oral, pré faringe, faringe, esófago, ventosa ventral e cecos digestivos divergentes e longos. Presença de dois ou mais testículos, saco do cirro normalmente presente, vesícula seminal externa e interna e ducto ejaculatório longo ou curto. Átrio genital presente, poro genital em posição ventral e ovário pré-testicular. Vesícula excretora em forma de I, poro excretor em posição terminal ou dorso-subterminal. Cercárias do tipo tricocercas ou, menos usualmente, microcercas (Bray, 1997).



## CAPÍTULO 2 – PROCEDIMENTOS, MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Hospedeiros intermediários estudados

#### 1.1.Primeiro hospedeiro primário: *Nassarius reticulatus* (Linnaeus, 1758)

Tabela 1- Classificação de *Nassarius reticulatus*



<b>Phylum</b>	Mollusca
<b>Classe</b>	Gastropoda
<b>Subclasse</b>	Prosobranchia
<b>Ordem</b>	Neogastropoda
<b>Superfamília</b>	Buccinaceae
<b>Família</b>	Nassariidae
<b>Gênero</b>	<i>Nassarius</i>
<b>Espécie</b>	<i>Nassarius reticulatus</i>

Fig. 19- Exemplar de *Nassarius reticulatus*.

*Nassarius reticulatus* (Fig. 19, Tabela 1) é um gastrópode marinho que pertence ao grupo dos prosobrânquios, e que se distribui geograficamente desde as Canárias e Açores até ao Norte da Noruega, por todo o mar Negro e Mediterrâneo (Fretter and Graham, 1994).

Com uma altura máxima aproximadamente de 30 mm, e largura de 14 mm, possui uma ornamentação formada por numerosas costas e estrias que se cruzam e originam um padrão reticulado. A abertura é pequena e oval, e o labro apresenta na parte exterior uma calosidade branca, e na parte interior uma crista com 6 a 9 dentes. A cor varia entre o castanho e o acinzentado.

Habitam preferencialmente sedimentos vasosos, no entanto também podem aparecer em substrato rochoso e arenoso. São necrófagos, e a sua longevidade pode atingir os 15 anos. As suas conchas, depois de mortos, são frequentemente ocupadas por paguros.

É um gastrópode encontrado abundantemente na zona de Aveiro, nomeadamente na Ria de Aveiro, e serve de hospedeiro intermediário a diversos tremátodes digenéticos sendo, desta forma, um vínculo fundamental ao fecho de vários ciclos de vida (Pina et al., 2007; Pina et al., 2009; Rato et al., 2009).

As fases larvares dos ciclos de vida dos digenéticos que poderão ser encontradas a infetar vários tecidos deste hospedeiro são: esporocistos, cercárias e metacercárias enquistadas (Pina et al., 2009).

Como espécies de digenéticos conhecidas e descritas neste gastrópode, em Portugal, temos: *Gynaecotyla adunca* (sinónimo *G. longiintestinata*) (Russell-Pinto and Bartoli, 2002; Pina et al., 2007), e as espécies descritas segundo Rato et al. (2009), *Lepocreadium album*, *Himasthla quissetensis*, *Diphtherostomum brusinae*, e *Cardiocephalus longicollis*.

## 1.2.Segundo hospedeiro intermediário: *Carcinus maenas*, (Linnaeus, 1758)

Tabela 2- Classificação de *Carcinus maenas*



Fig. 20- Exemplar de *Carcinus maenas*.

<b>Phylum</b>	Artropoda
<b>Classe</b>	Malacostraca
<b>Subclasse</b>	Eumalacostraca
<b>Ordem</b>	Decapoda
<b>Superfamília</b>	Portunoidea
<b>Família</b>	Portunidae
<b>Género</b>	Carcinus
<b>Espécie</b>	Carcinus maneas

O caranguejo verde, *Carcinus maenas* (Fig. 20, Tabela 2), é um caranguejo decápode, de coloração esverdeada ou avermelhada, coloração diretamente relacionada com diversos processos fisiológicos e ecológicos na espécie nativa das águas costeiras e estuarinas da Europa e Norte de África. Com uma grande tolerância à salinidade, temperatura, oxigénio e habitat, esta espécie tem invadido outras regiões do globo, provavelmente como resultado do transporte accidental das larvas na água de lastro de navios. Atualmente, encontram-se populações abundantes e bem estabelecidas nas costas leste e oeste da América do Norte e Sul, na África do Sul, sul da Austrália e Ásia, onde também serve de alimento a várias espécies de aves e peixes.

Em indivíduos adultos é possível determinar o sexo através de algumas características morfológicas e comportamentais, tais como a largura do cefalotórax (até 86 mm nos machos e 70 mm nas fêmeas), a forma do abdómen (triangular com 5 segmentos aparentes nos machos vs arredondado e com 7 segmentos nas fêmeas) (Fig. 21), o tamanho das pinças e patas torácicas (mais longas e largas nos machos) e as diferenças no comportamento quando ameaçados (os machos são mais agressivos e estendem as pinças e patas torácicas, enquanto que as fêmeas as encolhem para baixo do corpo).

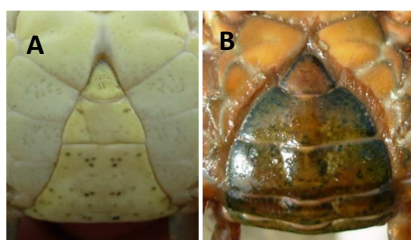


Fig. 21- *Carcinus maenas*. A- macho; B- fêmea  
Fonte: [https://pt.wikipedia.org/wiki/Carcinus\\_maenas](https://pt.wikipedia.org/wiki/Carcinus_maenas)

Serve como hospedeiro intermediário na fase de metacercária do ciclo de vida dos digenéticos, podendo ser encontradas no hepatopâncreas, gónadas, brânquias e glândula antenal (Pina et al., 2011).

Em Portugal, as espécies de parasitas trematódes descritas neste crustáceo são: *Maritrema portucalensis* (Pina et al., 2011), *Microphallus primas* (Pina et al., 2011), e *Gynaecotyla adunca* (Pina et al., 2007).

### 1.3.Segundo hospedeiro intermediário: *Polybius henslowii* (Leach, 1820)

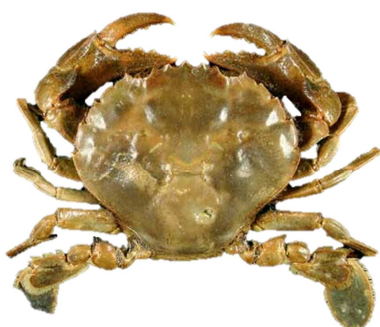


Fig. 22- Exemplar de *Polybius henslowii* Fonte:  
<http://www.crustaceology.com/?t=68&u=348662&g=396e663b6597e84ac882ad58aecdc630&q=6f543f6bbad48211dae60b59ad51c789>

Tabela 3 - Classificação de *Polybius henslowii*

<b>Phylum</b>	Artropoda
<b>Classe</b>	Malacostraca
<b>Subclasse</b>	Eumalacostraca
<b>Ordem</b>	Decapoda
<b>Superfamília</b>	Portunoidea
<b>Família</b>	Polybiidae
<b>Género</b>	Polybius
<b>Espécie</b>	Polybius henslowii

O pilado, *Polybius henslowii*, (Fig.22, Tabela 3) é um crustáceo da família Portunidae, com uma ampla distribuição no Atlântico, desde as ilhas Britânicas até Marrocos e mar Mediterrâneo. Na costa Portuguesa é mais frequentemente encontrado no Norte, entre os 20 e os 490 m de profundidade, apresentando um comportamento bentopelágico, podendo formar cardumes de elevada densidade.

Possuem uma coloração acastanhada, com um comprimento máximo de carapaça de 50 mm de largura do cefalotórax, e um peso individual médio de 26 g. Difere dos restantes crustáceos da família Polybiidae pelo facto do último par de pereiópodes ser achatado, permitindo ser um nadador exímio. Sem valor comercial ou gastronómico, é

um elemento importante na cadeia trófica marinha, visto servir de alimento a diversos grupos de animais, tais como peixes e aves (Magalhães et al., 2014).

Quanto a esta espécie de caranguejo, não existe nada descrito relativamente ao facto de ser hospedeiro intermediário de parasitas digenéticos.

### 2. Local de Colheita, Ria de Aveiro, Portugal

---

Segundo o autor Martins et al (2013), a Ria de Aveiro está localizada no litoral da Região Centro, ocupa uma área com cerca de 11.000 hectares, e é considerada uma das formações geológicas mais importantes e de elevado valor conservacionista no panorama nacional e internacional.

Até ao início da sua formação, por volta do século X, o mar atingia os atuais Concelhos de Estarreja e Aveiro, submergindo outros como Ovar, Murtosa e Mira, tendo posteriormente recuado no século XVI, dando origem a este complexo ecossistema estuarino. Para a comunicação com o oceano, foi construída uma barra em 1808 e fixada por dois molhes, impedindo a insalubridade resultante da estagnação das águas.

A Ria de Aveiro estende-se pelo interior, paralelamente ao mar, numa distância de 47 km e com uma largura máxima de 11 km, ao longo da costa Ocidental de Portugal, no sentido Este-Oeste, desde Ovar até Mira (latitude média 38°5'N). A área total da Ria, que está coberta durante a preia-mar, varia entre 83 km<sup>2</sup> em preia-mar e 66 km<sup>2</sup> em baixa-mar. A profundidade média é de aproximadamente 1 m, e a profundidade máxima é mantida artificialmente, nos canais de navegação, entre os 4 e os 7 metros (Dias et al., 1999).

Desdobra-se em quatro importantes canais ramificados em esteiros, que circundam inúmeras ilhas e ilhotas. É composta por quatro braços principais ramificados – Ovar, Murtosa, Vagos e Mira, e nela desaguam vários cursos de água, entre os quais o Vouga, Antuã, Caster, Mira e Boco.

A lagoa pode ser dividida em três zonas principais: a zona Sul inclui os Canais de Ílhavo e Mira, com 7 e 14 km de comprimento, e 200 a 300 metros de largura máxima respetivamente; o Canal de S. Jacinto - Ovar na zona norte tem 25 km de comprimento. No seu extremo norte este canal é muito pouco profundo, dando origem a uma rede

complexa de pequenos canais e bacias. A terceira zona, com uma geografia muito complexa, termina em frente à foz do rio Antuã (Martins et al., 2013).

O caudal médio de água doce que aflui à Ria é de cerca de 40 m<sup>3</sup>/s. Os rios Vouga e Antuã constituem as principais fontes de água doce, com caudais médios anuais de 24 m<sup>3</sup>/s e 2.4 m<sup>3</sup>/s, respetivamente (Dias et al., 1999).

A Ria alberga uma grande diversidade de habitats. Os sapais são locais de grande produtividade ecológica. Nas vasas e lodos, a descoberto na baixa-mar, surgem crustáceos e moluscos, enquanto nas salinas se concentram numerosas aves. O cordão dunar, para além de representar uma enorme barreira natural ao avanço do mar, caracteriza-se pela presença de comunidades vegetais específicas. Deste modo, esta zona de Aveiro constituiu uma zona de eleição para este estudo, pelo manancial de espécies aí encontradas, constituindo potenciais hospedeiros para os parasitas trematódes digenéticos completarem os seus ciclos de vida.

*Carcinus maenas*, *Polybius henslowii* e *Nassarius reticulatus* foram colhidos no canal de São Jacinto (estrada nº 327). O local de colheita localizava-se no Km 54, em frente à Reserva Natural de São Jacinto, Ria de Aveiro, Portugal (40°30'N; 8°43'W) (Fig.23).

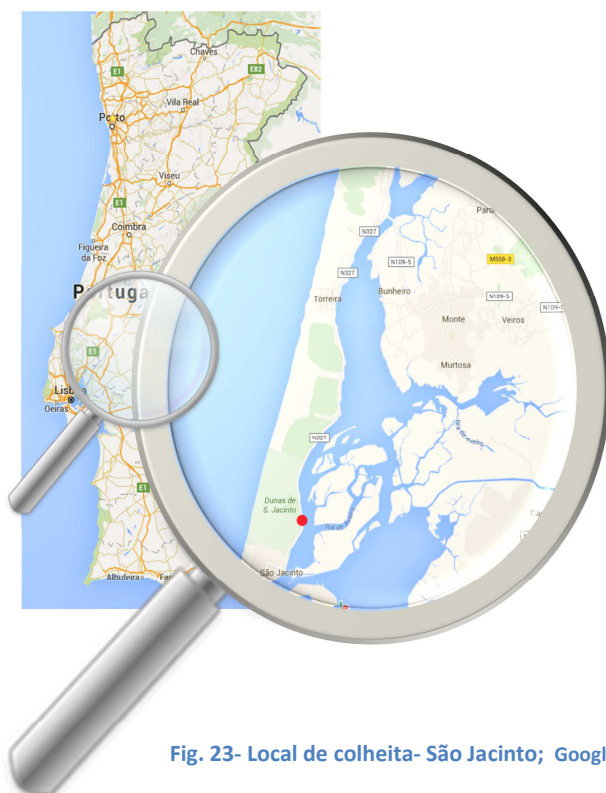


Fig. 23- Local de colheita- São Jacinto; Google maps

### 3. Colheita e manutenção dos hospedeiros

---

As colheitas foram efetuadas durante os meses de Abril e Maio de 2015, de acordo com as necessidades do trabalho, e foram efetuadas durante a maré baixa. Foi amostrado um total de 46 espécimes de *Nassarius reticulatus*, 20 caranguejos *Polybius henslowii* e 93 caranguejos *Carcinus maenas*.

Para a colheita dos gastrópodes e dos caranguejos foi utilizado como isco, peixe em decomposição durante 4 dias. Os caranguejos foram apanhados com o auxílio de um camaroeiro, e os gastrópodes foram manualmente desenterrados do substrato lodoso.

Após a colheita, os caranguejos foram colocados num aquário de vidro, com água transportada do local de colheita, continuamente filtrada e aerificada. Foram diariamente alimentados com pequenos pedaços de peixe congelado.

Os gastrópodes foram colocados em tinas de vidro contendo água da Ria filtrada e oxigenada (Fig.24) e mantidos à temperatura do laboratório ( $\pm 26^{\circ}\text{C}$ ), a fim de se obter a emissão natural de cercárias. Depois da água de cada tina ter sido observada diariamente à lupa binocular, esta foi mudada e os animais transferidos para recipientes limpos. Por vezes, foi necessário recorrer a água preparada artificialmente, a partir de água do mar e água doce, para que a salinidade se mantivesse próxima dos valores registados no local de colheita.

No período das colheitas procedeu-se também ao registo dos valores de temperatura e salinidade *in situ*, tendo sido igualmente medidos em laboratório de modo a serem mantidos constantes os respetivos valores no aquário. Os animais ficaram sujeitos a um fotoperíodo artificial aproximadamente 12h dia / 12h noite.

Este estudo permitiu também o cálculo da prevalência e intensidade de infestação das espécies de parasitas observadas.



Fig. 24- *N. reticulatus* em tinas de vidro.



#### 4. Identificação e contagem de parasitas

---

As cercárias emitidas pelo molusco gastrópode *N. reticulatus*, foram retiradas da água de cada uma das tinas com a ajuda de uma pipeta Pasteur, e foram colocadas em pequenos cristalizadores contendo água da Ria filtrada. Algumas foram dispostas entre lâmina e lamela para observação, ao microscópio ótico, de características anatómicas apenas visíveis em espécimes vivos (ex.: glândulas de penetração e sistema excretor) e para efetuarmos o registo fotográfico *in vivo*. Outras foram fixadas para microscopia ótica, e alguns exemplares foram colocados num tubo eppendorf contendo 50 µL de água destilada e guardado a -20°C, para posterior extração de DNA. Contabilizou-se o número de gastrópodes que expulsaram cercárias, para o cálculo da prevalência da infeção.

Procedeu-se, também, à dissecação diária dos caranguejos *P. henslowii* e *C. maenas*, a fim de despistar possíveis parasitas digenéticos. Os crustáceos foram eutanaziados, tendo sido colocados numa tina de vidro com tampa, no interior da qual se dispôs algodão embebido em clorofórmio, durante cerca de 30 minutos, no mínimo. Para a dissecação, propriamente dita, introduziu-se a ponta da tesoura na membrana articular, situada por cima da última pata ambulatória, e a carapaça foi, deste modo, cortada ao longo do bordo póstero-lateral até ao dente mais posterior, seguida de incisão paralela ao bordo anterior, fazendo isto de ambos os lados (Fig. 25). Os órgãos para estudo (gónadas, hepatopâncreas, brânquias e glândulas antenais) foram retirados, separados e pressionados entre duas tampas de uma caixa de Petri para a visualização, por compressão, à lupa binocular, dos quistos de metacercárias (Fig. 26). De seguida, procedeu-se à sua contagem. Nos órgãos cuja percentagem de infeção era elevada, a contagem foi efetuada com a ajuda de uma grelha com quadrados de 1 cm de lado, desenhada numa das tampas da caixa de Petri. A prevalência e intensidade foram calculadas segundo a fórmula: prevalência = número de caranguejos infetados / número de caranguejos examinados x 100 e intensidade média = número de parasitas / número de caranguejos parasitados Bush et al. (1997).

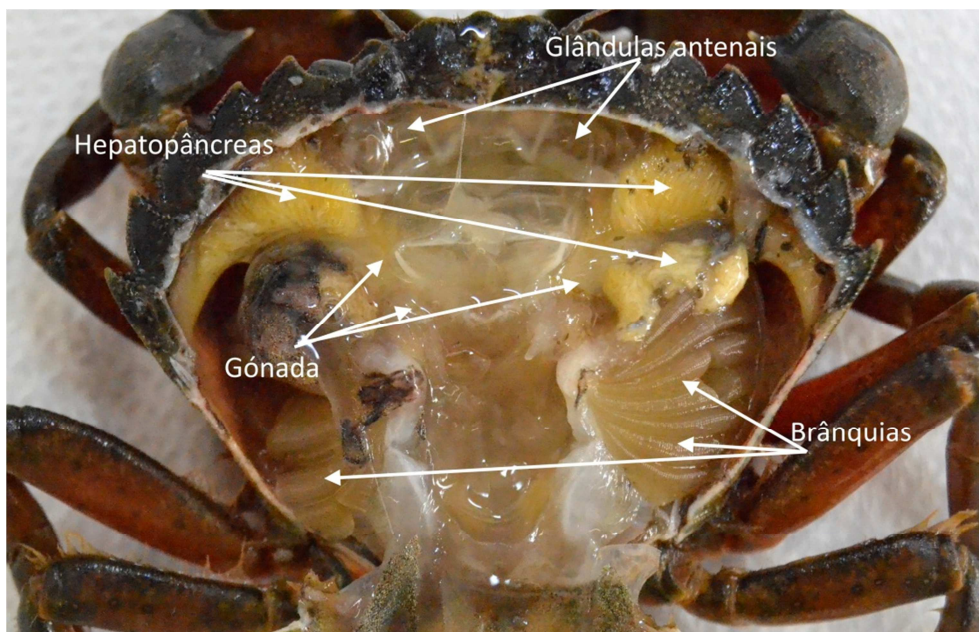


Fig. 25 - *C. maenas* dissecado dorsalmente e identificação dos órgãos estudados.

Após a contagem, com a ajuda de duas agulhas de dissecação, os quistos foram isolados e colocados em cristalizadores contendo água da Ria filtrada. Foram obtidas imagens *in vivo* no microscópio ótico para a medição do comprimento e largura. Cerca de 50 indivíduos de formas distintas provenientes de diferentes órgãos, foram congelados a -20°C em tubos de eppendorf contendo 50µl de água destilada. Isolaram-se também cerca de 10 a 20 quistos de cada grupo com a finalidade de efetuar o desenquistamento bioquímico, a fim de obter metacercárias livres.

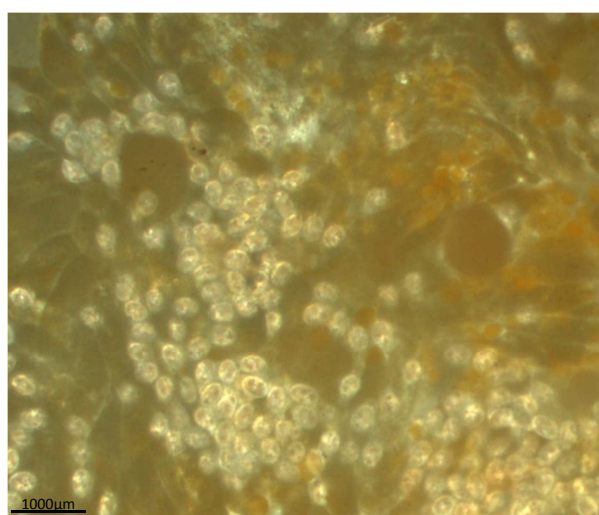


Fig. 26- Quistos de metacercárias encontrados no hepatopâncreas de *Carcinus maenas*, visualizados à lupa binocular.

## 5. Desenquistamento bioquímico das metacercárias

---

Os quistos previamente isolados foram desenquistados, utilizando um meio adaptado do descrito por (Irwin et al., 1984).

O desenquistamento foi efetuado em estufa, a uma temperatura de 39° durante 20 a 60 minutos, com observações à lupa binocular de 5 em 5 minutos, de forma a que as metacercárias já desenquistadas não permanecessem desnecessariamente, durante períodos longos, no meio de desenquistamento.

Solução de desenquistamento:

1º meio

- |  |                    |
|--|--------------------|
| • 0,8% w/v de cloreto de sódio (NaCl)                                  | 0.08g              |
| • 1,5% w/v de bicarbonato de sódio (Na <sub>2</sub> HCO <sub>3</sub> ) | 0,15g              |
| • 0,25% w/v de taurocholato de sódio (bílis de boi)                    | 0,025g             |
| • 0,25% w/v de tripsina (4°C)  | 0,025g             |
| • Água destilada   | perfazer até 10 ml |

Meio final de desenquistamento

- |                          |                    |
|--------------------------|--------------------|
| • 1º meio                | 5 ml               |
| • Cisteína               | 0,04g              |
| • Ácido clorídrico (HCl) | 1 ml               |
| • Água destilada         | perfazer até 10 ml |

Apesar de se ter revelado eficaz, algumas metacercárias não desenquistaram após 60 minutos na estufa, pelo que foram sujeitas a um desenquistamento mecânico, com o auxílio de material cirúrgico e à lupa binocular.

## 6. Fixação para microscopia ótica

---

Os estádios larvares (cercárias e metacercárias) foram fixados segundo Bartoli et al. (2000), de forma a ser possível a observação de alguns detalhes anatômicos dos parasitas. Os indivíduos isolados foram colocados entre lâmina e lamela com algumas gotas de água da Ria filtrada. Encostado a uma das extremidades da lamela colocou-se um pouco de papel de filtro de forma a absorver o excesso de água, para que os espécimes ficassem distendidos. De seguida, foi utilizada a chama de um isqueiro na parte inferior da lâmina, durante 5 ou 6 segundos, com o intuito de fixar os parasitas à lâmina. Imediatamente a seguir, com uma pipeta Pasteur encostada numa das extremidades da lamela, preencheu-se com Bouin. As lâminas permaneceram mergulhadas no fixador durante 2 a 3 dias. Passado o tempo de fixação, a lâmina foi lavada com vários banhos de água destilada, de forma a retirar o excesso de Bouin, e com a ajuda de um pincel, os parasitas foram descolados da lâmina e depositados num cristalizador. A água foi então substituída por álcool a 70%, e assim poderiam permanecer fixados.

### 6.1. Coloração para microscopia ótica

---

Os parasitas foram imersos em algumas gotas de Hemalumen filtrado durante, no máximo, 5 minutos. Logo de seguida, foram submetidos a vários banhos de água destilada, e caso a coloração estivesse demasiado escura, os parasitas eram imersos em álcool a 70% clorídrico, a fim de melhorar a diferenciação, controlando o tempo à lupa binocular, e logo de seguida foram transferidos para álcool a 70% de forma a suspender a diferenciação. A preparação definitiva termina com a desidratação, submetendo os parasitas a banhos sucessivos de concentrações crescentes de álcool, depois por misturas de álcool-xilol, segundo a seguinte ordem:

- Álcool a 95% (2 banhos de 10 minutos cada)
- Álcool a 100% (3 banhos de 10 minutos cada)
- $\frac{3}{4}$  de álcool a 100% +  $\frac{1}{4}$  de xilol (1 banho de 10 minutos)
- $\frac{1}{2}$  de álcool a 100% +  $\frac{1}{2}$  de xilol (1 banho de 10 minutos)
- $\frac{1}{4}$  de álcool a 100% +  $\frac{3}{4}$  de xilol (1 banho de 10 minutos)
- Xilol (1 banho de 10 minutos)

Montou-se entre lâmina e lamela com o meio de montagem DPX, tendo sempre o cuidado de evitar bolhas de ar, e evitar que os parasitas saíssem do espaço da lamela. A lâmina foi deixada a secar durante 2 dias em posição horizontal, etiquetada e limpa, estando desta forma pronta para a sua visualização ao microscópio ótico. Na observação é necessária a pesquisa do maior número de detalhes possível, com vista à identificação específica dos diferentes digenéticos. As fotografias foram realizadas com diferentes ampliações, tendo sido usada uma máquina fotográfica Olympus U-CMAD 3 Colorview IIIu, acoplada ao microscópio Olympus Cx31.

## 7. Fixação para microscopia eletrónica de varrimento (MEV)

---

As metacercárias e as cercárias, depois de convenientemente isoladas, passam por duas fases, a fixação e a desidratação, tal como na fixação para microscopia ótica. Durante a fase de fixação, os indivíduos foram colocados em cristalizadores contendo água da Ria filtrada. A essa água, foram adicionadas algumas gotas do fixador glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7.4, para que os parasitas se distendessem. De seguida, o material biológico foi fixado durante 2h a 4°C, no mesmo tampão anteriormente utilizado, e pós-fixado 1h à temperatura ambiente em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão novamente.

De seguida procedeu-se à fase de desidratação, compreendida por banhos sucessivos de concentrações crescentes de álcool:

- Álcool a 50% (1 banho de 15 minutos)
- Álcool a 75% (1 banho de 30 minutos)
- Álcool a 90% (1 banho de 30 minutos)
- Álcool a 95% (1 banho de 30 minutos)
- Álcool a 100% (30 + 15 minutos)
- Álcool a 100% (30 + 30 minutos)

Após fixados e desidratados, os indivíduos foram submetidos ao ponto crítico em CO<sub>2</sub>, colocados em suportes metálicos e cobertos por um filme de ouro (JFC-1100 JEOL) de forma a poderem ser observados ao microscópio eletrónico de varrimento de referência JEOL-JSM-6301 F, operando a 15KV (CEMUP-Porto) e fotografados com diferentes ampliações.

## 8. Análise molecular

---

### 8.1. Regiões genéticas usadas para inferir relações filogenéticas

Como já foi referido anteriormente, os tremátodes digenéticos são caracterizados por um ciclo de vida complexo, envolvendo dois ou mais hospedeiros e vários estádios larvares, os quais parasitam organismos diferentes. Em muitas espécies, só o adulto foi descrito morfológicamente, não sendo conhecidos os respetivos estádios larvares. É desta forma que os métodos moleculares são uma ferramenta essencial para a identificação das larvas.

O alvo de interesse são os genes nucleares do RNA ribossómico que codificam o RNA estrutural dos ribossomas, e que nos eucariotas tendem a ocorrer como uma série de unidades repetitivas, em tandem, cada uma delas contendo três regiões codificantes (18S, ~2000pb; 5.8S, ~150pb; 28S, ~4500pb), separadas por vários espaços internos transcritos (ITS), também designados de intrões (Fig.27).

Essa região é altamente conservada, intraespecificamente, mas variável entre diferentes espécies, o que possibilita a distinção ao nível específico, e pode ser amplificada com *primers* específicos ancorados nessas três regiões codificantes.

Uma característica bastante útil das unidades repetitivas do RNA ribossómico, é o facto de que estas tendem a ser semelhantes dentro do mesmo indivíduo, ou entre indivíduos da mesma espécie, processo chamado de “evolução equilibrada”. Ou seja, a sequência genética de um indivíduo deve ser representativa da sua espécie (Blair et al., 1996).

Para cada *taxon*, os dados obtidos compreendem uma sequência de nucleótidos (A, C, G, T/U), que, por sua vez, será alinhada com outras sequências para o reconhecimento de regiões homólogas. O alinhamento pode ser efetuado com programas informáticos, contudo o que o olho humano considerar como alinhamentos inaceitáveis, será reajustado manualmente, de forma a evitar erros nas relações filogenéticas.

Neste estudo, utilizou-se o ITS1 rDNA para a determinação das metacercárias encontradas em *P. henslowii* e *C. maenas* e o ITS2 rDNA para a determinação das cercárias emitidas por *N. reticulatus*.

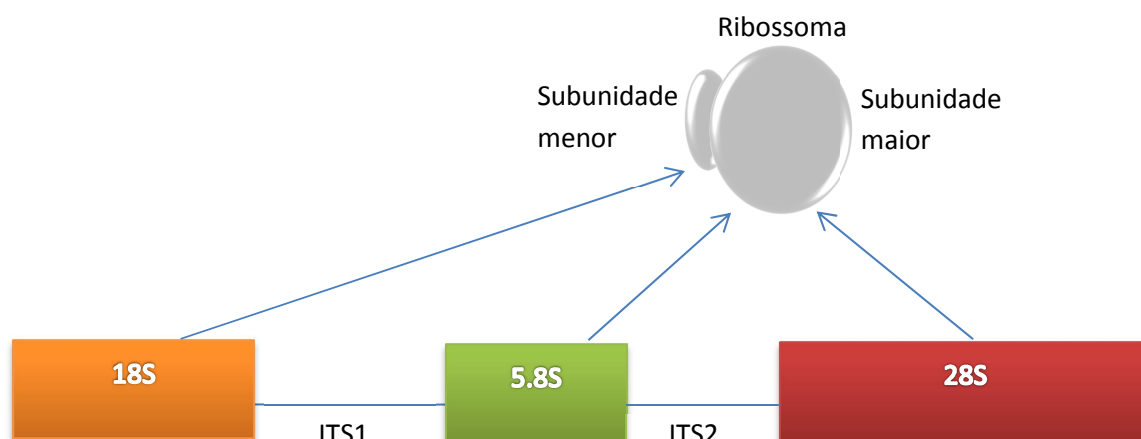


Fig. 27- Genes nucleares do RNA ribossômico que codificam o RNA estrutural dos ribossomas.

## 8.2.Extração de DNA

Para a extração de DNA utilizou-se um Kit da SIGMA (GenElute™ Mammalian Genomic DNA Kit), e seguiu-se o protocolo recomendado ao tipo de tecido.

Centrifugou-se uma amostra com cerca de 50 organismos, morfologicamente idênticos, tais como tamanho, forma e estruturas morfológicas visíveis, durante 5 minutos a 10000 rpm's. Rejeitou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em 200 µL de solução de ressuspensão, seguida de 200 µL de solução de lise C, 20 µL de proteinase K (20 µg/ µL), e por fim, igual volume de RNase A. A digestão foi efetuada overnight em banho-maria a 55°C segundo (Pina, Russell-Pinto et al. 2007). Posteriormente, adicionou-se à amostra 200 µL de etanol absoluto p.a. e inverteu-se o tubo várias vezes a fim de se obter uma solução homogênea. Humedeceu-se a membrana com a passagem de 500 µL da solução de preparação da membrana a qual, tal como o etanol, proporciona uma maior adesão do DNA à membrana. Fez-se passar a solução na membrana, seguida de duas lavagens de 500 µL para a remoção dos contaminantes com uma solução de lavagem previamente diluída com etanol absoluto p.a.. O DNA foi eluído num volume dependente do tamanho da amostra inicial (50 a 200 µL), pela adição da solução de eluição (10 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA, pH 9.0).



### 8.3. Polymerase Chain Reaction (PCR)

O PCR é uma técnica que permite a síntese *in vitro* de sequências específicas de DNA. O seu princípio baseia-se na capacidade da enzima *Taq* polimerase amplificar um fragmento localizado entre duas regiões de DNA de sequência parcial ou totalmente conhecida, através de um par de oligonucleótidos (*primers*) sintetizados de modo a que sejam complementares ao fragmento de DNA que se pretende multiplicar.

Os *primers* utilizados foram, um *primer* forward (A ITS1 Fw), específico dos digenéticos, localizado a 195 pares de bases (pb) da região terminal 3' do gene 18S rDNA (5'-GGT AAG TGC AAG TGC AAG TCA TAA GC-3') ( $T_m = 58^\circ\text{C}$ ) e um *primer* universal reverse (A ITS1 Rev), localizado a 35 pb da região terminal 5' do gene 5.8S rDNA (5'-GCT GCG CTC TTC ATC GAC A-3') ( $T_m = 60^\circ$ ) (Bartoli et al., 2000). Foram utilizados também, *primers* mais internos na região ITS1, o *primer* forward (N ITS1 Fw) localizado a 22 pb da região terminal 3' do gene 18S rDNA (5'-CGT AAC AAG GTT TCC GTA G-3') ( $T_m = 56^\circ\text{C}$ ) e o *primer* reverse (N ITS1 Rev) a 97pb da região terminal 3' do gene ITS1 rDNA (5'- TGT TGA GGC AAT GGA ACA-3') ( $T_m = 52^\circ\text{C}$ ) (Pina et al., 2007). As reações de polimerização em cadeia foram realizadas num volume total de 50  $\mu\text{L}$  (36,3  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O destilada estéril, 5  $\mu\text{L}$  Taq buffer (10x) (Invitrogen), 1  $\mu\text{L}$  dNTP MIX (10 mM) (Invitrogen), 1,5  $\mu\text{L}$  MgCl<sub>2</sub> (50 mM) (Invitrogen), 0,5  $\mu\text{L}$  de cada *primer* (40 pmol/ $\mu\text{L}$ ), 0,2  $\mu\text{L}$  Platinum® Taq DNA polymerase (5 U/ $\mu\text{L}$ ) (Invitrogen), 5  $\mu\text{L}$  DNA (template). A quantidade de DNA poderá variar, tendo sempre de fazer ajustes no volume de H<sub>2</sub>O, de forma a manter o volume final de 50  $\mu\text{L}$ .

O programa de amplificação usado foi o utilizado em Pina et al. (2007) com os seguintes passos:

- Desnaturação:  $94^\circ\text{C}$  durante 5 minutos;
  - Manutenção da cadeia aberta:  $94^\circ\text{C}$  durante 30 segundos;
  - Ligação dos *primers*:  $54^\circ\text{C}$  durante 30 segundos;
  - Extensão:  $72^\circ\text{C}$  durante 120 segundos;
  - Elongação final:  $72^\circ\text{C}$  durante 10 minutos
- } 40 ciclos



### 8.3.1. Eletroforese em gel

Os produtos resultantes da PCR foram sujeitos a uma eletroforese em gel de agarose 1%, e para a sua elaboração, misturaram-se num matraz de 100 ml, 50 mg de agarose (SIGMA) em 50 ml de tampão Tris-Acetato (TAE) a 1x (diluído a partir de tampão TAE 50x: 24,5g TRIS; 5,71 ml de ácido acético glacial, 20 ml de EDTA 0,25 M pH 8,0; H<sub>2</sub>O destilada até completar o volume de 1000 ml). Depois de dissolvida a agarose, por aquecimento no micro-ondas a 700 watts durante 2 minutos, na hotte, adicionou-se 17 µl de uma solução de brometo de etídio (Sigma) a 1 mg/ml.

O gel foi então colocado numa tina de eletroforese, coberta com tampão TAE 1x, e 6 µL de cada amostra de PCR foram adicionadas a 2 µL de gel loading buffer 6x – Dye (0,25% de azul bromofenol em 0,25% de xileno de cianol e 15% de ficoll), que para além de ser um indicador de migração, também confere peso ao DNA. Gerou-se então uma corrente elétrica sob uma voltagem constante de 80V, durante 1h30, para que a migração do DNA ocorresse. Para a confirmação do tamanho das bandas obtidas, as amostras foram corridas juntamente com 6 µL de DNA marcador (Invitrogen 1Kb Plus DNA ladder), adicionado a um dos poços do gel.

O gel foi então observado num transiluminador (Dual-Intensity transilluminator UVP) e as fotografias foram obtidas pelo uso de um transiluminador UV (GelDoc XR System, Bio-Rad).

### 8.3.2. Purificação dos produtos de PCR

Todo o restante produto de PCR misturado com gel loading buffer foi distribuído por 3 poços de gel de agarose 1% (50 mg de agarose, 50 ml de TAE 1x, 17 µL brometo de etídio) e procedeu-se novamente a eletroforese (80V, 1h30-2h) e observação das bandas sob o transiluminador. As bandas pretendidas foram cortadas com a ajuda de um bisturi estéril e colocadas num eppendorf estéril. Os produtos resultantes da amplificação do PCR foram purificados pelo uso de um Kit da QIAGEN (QIAquick® Gel Extraction Kit), de forma a extrair o DNA do gel de agarose, e para isso obteve-se o peso do gel cortado com as bandas e adicionou-se ao eppendorf 3 volumes de buffer QG por cada volume de gel (100 mg  $\cong$  100 µl), e incubou-se o tubo a 50°C em banho-maria, durante 10 minutos, vortexando a cada 2-3 minutos até a solubilização completa da agarose. Adicionou-se 1 volume de isopropanol (Sigma), que tem como função melhorar a adesão dos fragmentos de DNA à membrana de sílica, quando o homogeneizado por centrifugação a 12000 x g, passa através dela. Efetuou-se uma lavagem com buffer PE (700 µL) previamente diluído

com etanol absoluto de forma a remover tudo o que não fosse DNA, da membrana de sílica. O DNA foi eluído com 30 a 50  $\mu\text{L}$  de água tamponada estéril pH 7.48, deixando-se incubar durante 5 minutos e finalmente com uma centrifugação a uma velocidade máxima de 15000 x g, foi então extraído o DNA da membrana.

### 8.3.3. Sequenciação

Do DNA extraído da membrana, retirou-se 15  $\mu\text{L}$  e enviou-se para a empresa STABVIDA, a fim de serem sequenciadas diretamente, juntamente com os respetivos *primers*, de acordo com as especificações da empresa.

Recebida a sequencia, esta foi trabalhada com o software Finch TV 1.5.0 de forma a conseguir uma sequência completa da espécie em questão, e analisada no banco de dados da Genbank.

## CAPÍTULO 3 - RESULTADOS

### 1. Análise dos crustáceos amostrados

Um total de 113 caranguejos das espécies *Polybius henslowii* e *Carcinus maenas*, foram coletados na estação 1 da Ria de Aveiro, entre Maio e Junho de 2015, tendo sido todos dissecados. Para cada organismo foram registados, o género, a largura do cefalotórax e o número de parasitas observados em cada um dos órgãos isolados (brânquias, glândula antenal, hepatopâncreas e gónadas) (ANEXO 1).

### 2. Caracterização da infeção de *P. henslowii* e *C. maenas* por Digenea

Os valores relativos ao número total de parasitas observados, e em cada um dos respetivos órgãos isolados, estão disponíveis na Tabela 4.

Tabela 4- Nº de *P. henslowii* e *C. maenas* dissecados e parasitados, entre Maio e Junho de 2015 na estação 1 da Ria de Aveiro. Nº total de parasitas observados nos diferentes órgãos isolados.

<b><i>P. henslowii</i></b>	Nº dissecados = 20			
	Brânquias	Gl. antenal	Hepatopâncreas	Gónada
Parasitados	0	2	6	0
Nº quistos observados	0	12	70	0
<b><i>C. maenas</i></b>	Nº dissecados = 93			
	Brânquias	Gl. antenal	Hepatopâncreas	Gónada
Parasitados	9	18	60	3
Nº quistos observados	60	1528	9999	51

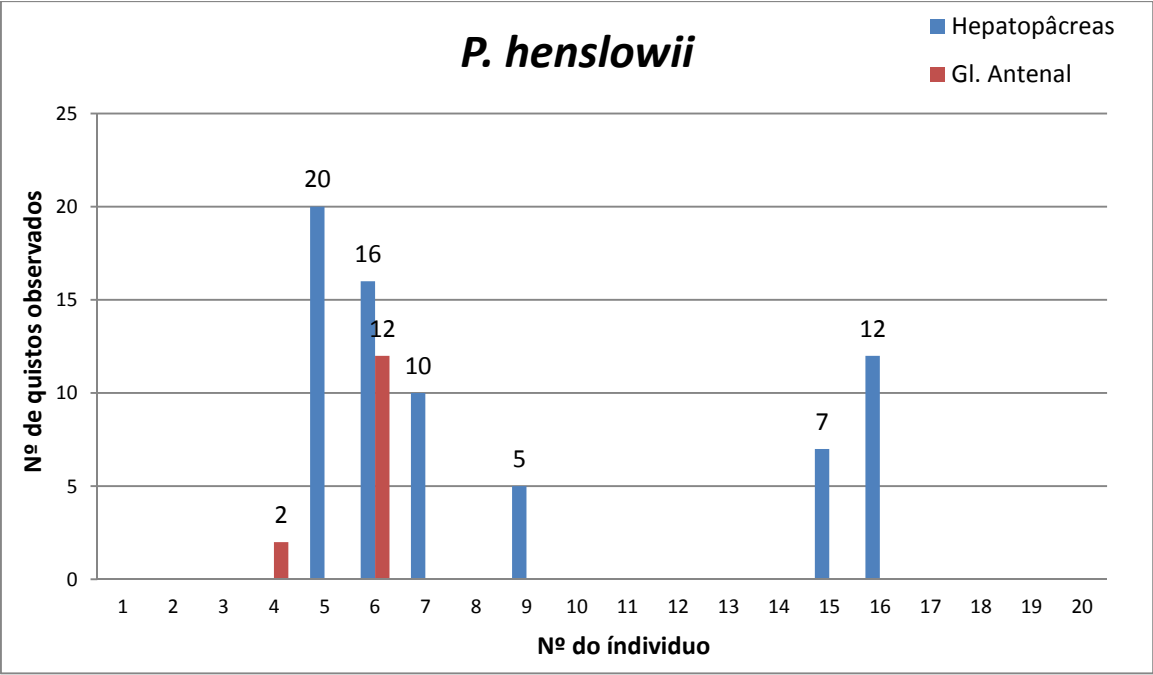


Gráfico 1- Nº de quistos observados no hepatopâncreas e glândulas antenais de *P. henslowii*

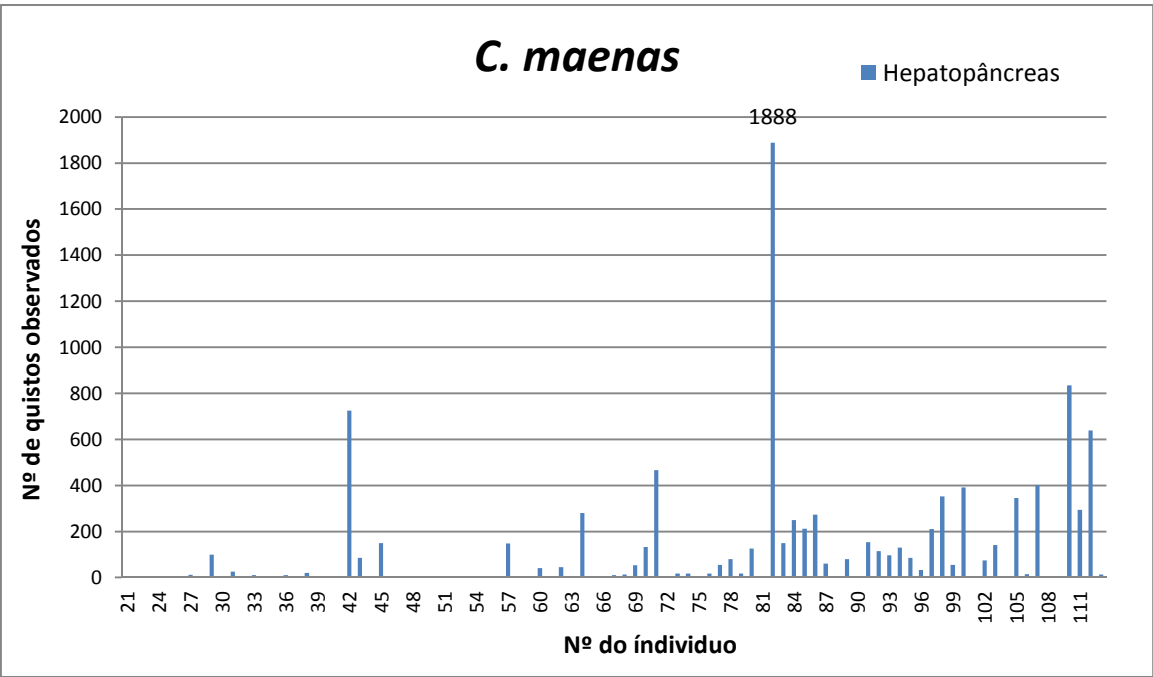


Gráfico 2- Nº de quistos observados no hepatopâncreas de *C. maenas*.

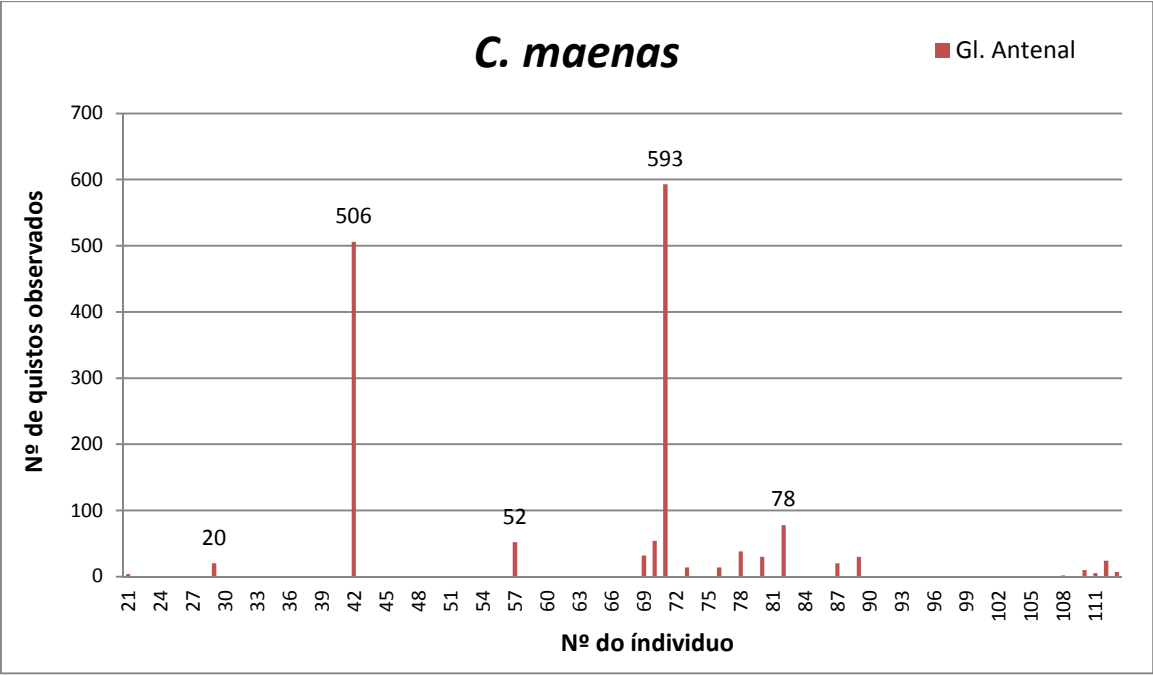


Gráfico 3- Nº de quistos observados nas glândulas antenais de *C. maenas*.

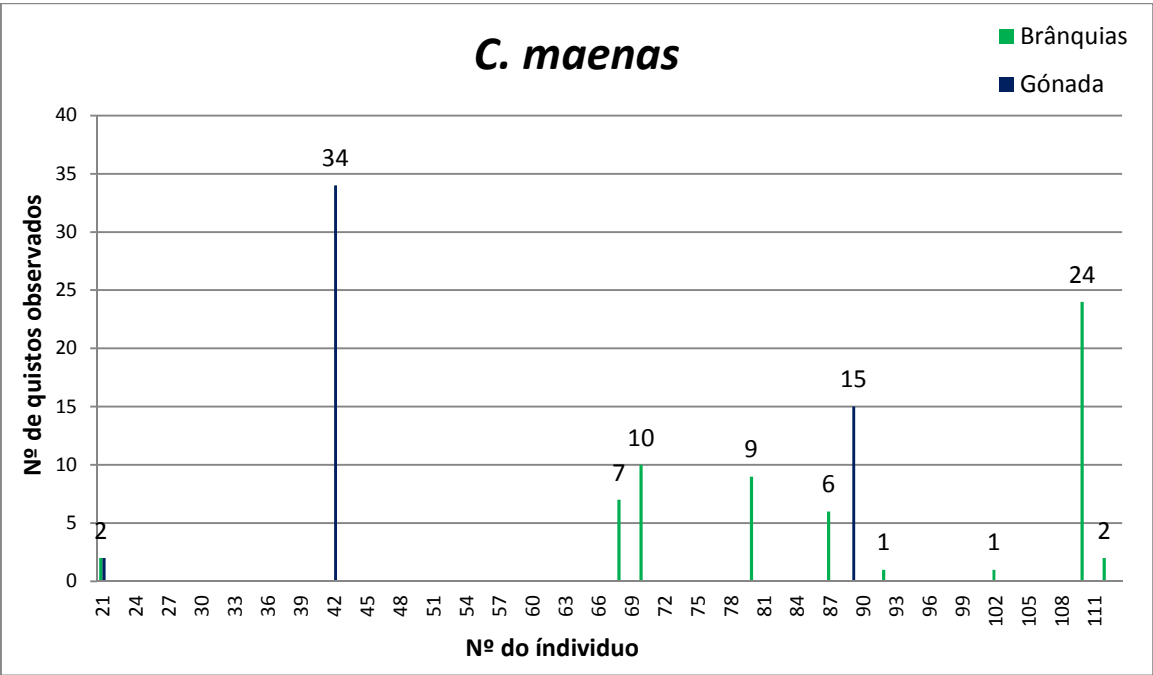


Gráfico 4- Nº de quistos observados nas brânquias e gónadas de *C. maenas*.

❖ Prevalência e Intensidade média de Infestação

Em relação a *P. henslowii*, a prevalência de infestação foi de 35%, e para *C. maenas* esse valor foi de aproximadamente 66%. Verificou-se também que, para ambas as espécies de crustáceos, a intensidade média de infestação é mais alta no hepatopâncreas (3.5 em *P. henslowii* e 107.5 em *C. maenas*), seguindo-se a glândula antenal (0.6 e 16.43 respectivamente).

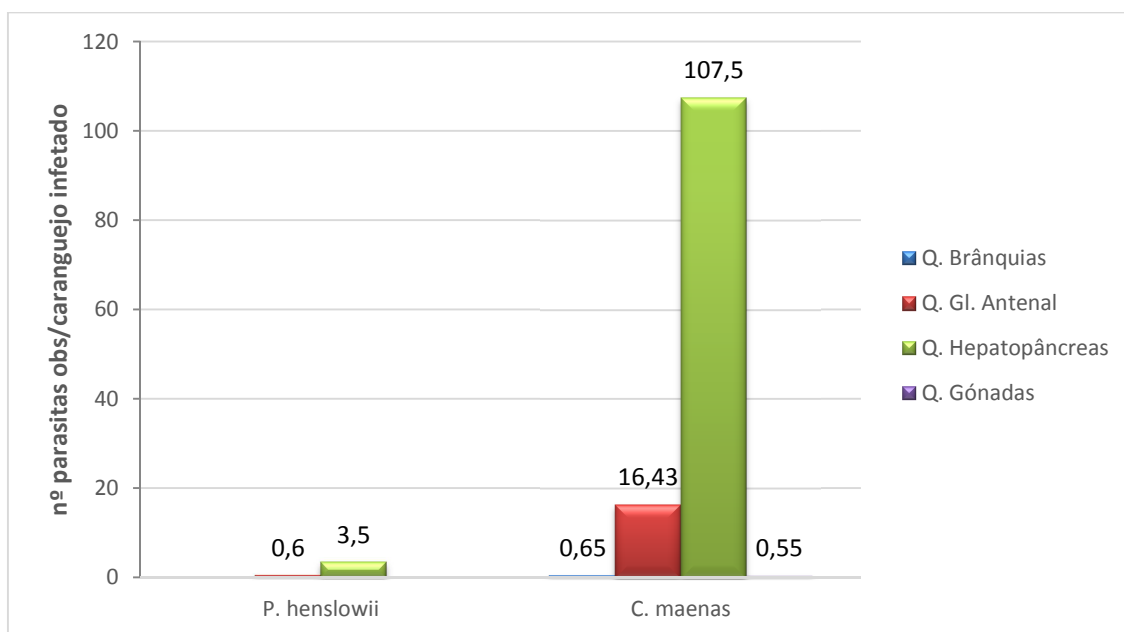


Gráfico 5- Distribuição da intensidade média de infestação em *P. henslowii* e *C. maenas*.

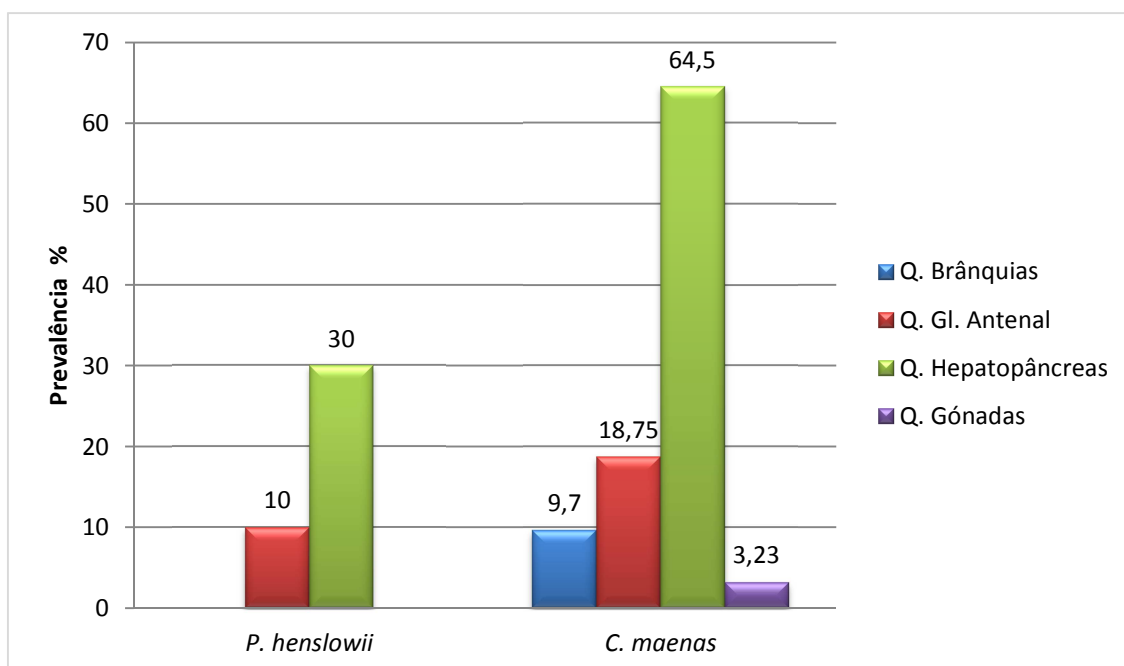


Gráfico 6- Distribuição da prevalência em *P. henslowii* e *C. maenas*.

No gráfico 5 estão representados os valores de intensidade média, em cada órgão pesquisado, quer para *P. henslowii*, quer para *C. maenas*. Rapidamente se conclui que o órgão que se encontrou mais infetado foi o hepatopâncreas, atingindo, na espécie *C. maenas*, um máximo de 1888 parasitas, como se pode verificar no gráfico 2, e na espécie *P. henslowii* um número máximo de 20, gráfico 1. Nos gráficos 3 e 4 observa-se o número de quistos encontrados nos restantes órgãos de *C. maenas*.

Optou-se por elaborar vários gráficos para a espécie *C. maenas*, uma vez que a escala de valores, relativamente aos quistos isolados do hepatopâncreas e das glândulas antenais, é mais elevada que as restantes, pelo que as variações não são tão perceptíveis.

## 2.1. Caracterização morfológica, ultraestrutural e molecular dos quistos encontrados em *P. henslowii*

---

### 2.1.1. Descrição das metacercárias em microscopia ótica

Num total de 20 caranguejos *P. henslowii* dissecados, 6 estavam parasitados. As metacercárias apresentavam-se em quistos, morfológicamente idênticos, com uma forma que não é perfeitamente esférica, de diâmetro médio de 297,15 µm. A espessura da parede do quisto varia consoante o grau de maturação, e era nitidamente constituída por duas camadas, nem sempre distinguíveis, uma camada interna e outra externa, sendo esta última a mais espessa, na maioria dos casos. No interior do quisto encontra-se a metacercária, e quando observada ao microscópio entre lâmina e lamela, é possível observarem-se algumas estruturas tais como a ventosa oral, a faringe e os cecos digestivos (Fig. 28).

Após o desenquistamento, a metacercária (Fig.29) apresenta um formato piriforme, de comprimento médio 446,155 µm, e o tegumento é revestido por espinhos até à região testicular. A ventosa oral, subterminal, é seguida de uma pré faringe curta, uma faringe muscular e um esófago. Os cecos digestivos, com paredes espessas, terminam na zona testicular, e observam-se também duas ventosas ventrais, arredondadas, a esquerda (anti-poral) um pouco maior que a direita (poral).

O aparelho reprodutor feminino é constituído por um ovário, com forma quase esférica, situado à esquerda e por cima da ventosa antiporal. O metratermo encontra-se no átrio genital, na proximidade do orifício ejaculador e é pouco indiferenciado (Fig.29).

O aparelho reprodutor masculino é constituído por dois testículos, simétricos, com forma oval ou esféricos. O saco vesículo-prostático está numa posição transversal, possui forma arqueada e encerra uma vesícula seminal e glândula da próstata de reduzidas dimensões. O átrio genital, situado à direita da ventosa ventral poral, contém um órgão que se designa cornucótilo e que é constituído por duas peças globosas. A primeira é a mais externa, tem forma de meia lua crescente e a parte côncava está dirigida para o interior. A segunda peça é interior e mais pequena que a primeira. É possível observar a presença de três placas quitinosas, uma situada na face externa, outra na interna e uma disposta na parede atrial, junto ao saco vesículo-prostático (Fig.30).

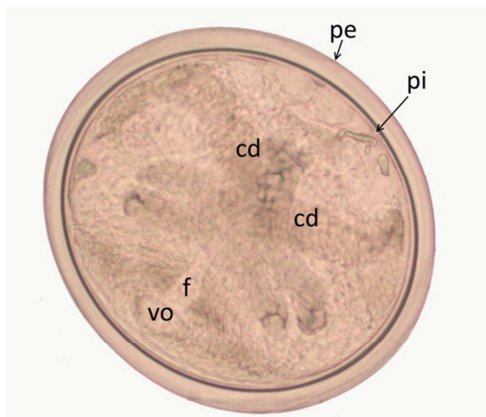


Fig. 28- Metacercária enquistada encontrada no hepatopâncreas de *P. henslowii*. pe- parede externa; pi- parede interna; vo- ventosa oral; f- faringe; cd- cecos digestivos

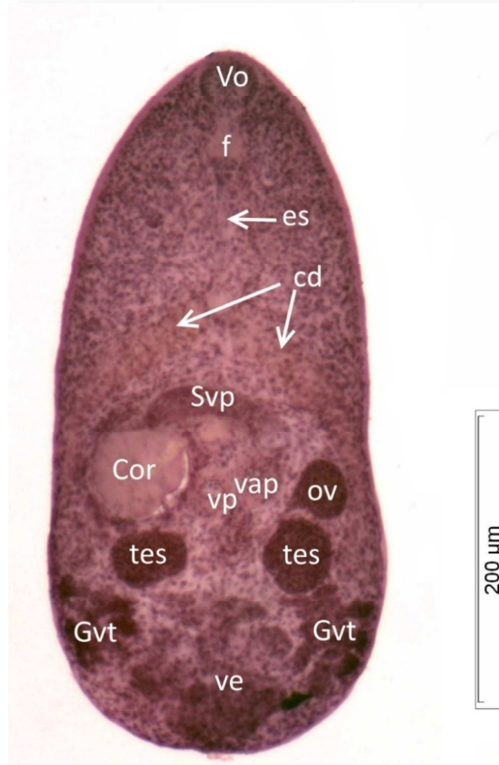


Fig. 29- Metacercária desenquistada bioquimicamente (vista ventral). Vo- ventosa oral; f- faringe; es- estômago; cd- cecos digestivos; Svp- saco vesículo-prostático; Cor- cornucotile; vp- ventosa ventral poral; vap- ventosa ventral anti-poral; ov- ovário; tes- testículo; Gvt- glândulas vitelárias; ve- vesícula excretora.



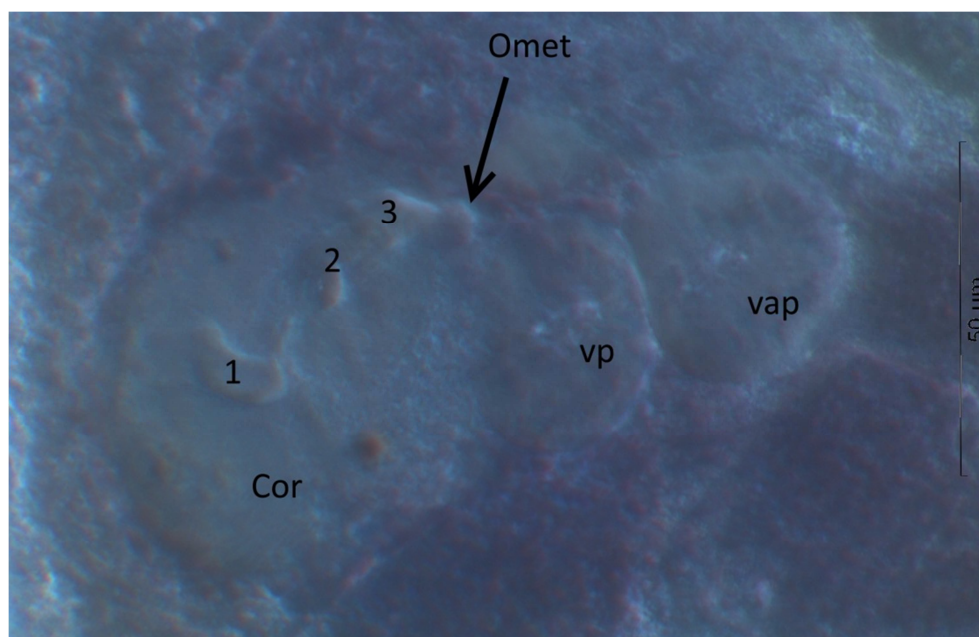


Fig. 30- Região médio-posterior da metacercária desenquistada. Cor- cornucotile; vp- ventosa ventral poral; vap- ventosa ventral anti-poral; Omet- orifício do metratermo; 1, 2 e 3- peças quitinosas do cornucótile.

#### 2.1.2. Descrição das metacercárias em microscopia eletrônica de varrimento

Através da microscopia eletrônica de varrimento, além de se confirmar a morfologia verificada na microscopia ótica, observam-se características morfológicas típicas da espécie, entre as quais, a presença de uma depressão ventral transversal, situada aproximadamente ao nível da bifurcação dos cecos digestivos (Fig.31 A). O tegumento encontra-se revestido por espículas cuticulares. Na face ventral e anterior as espículas são largas, com cerca de 11 a 15 projeções digitadas e direcionadas para a região posterior (Fig. 31 B). Na face ventral e posterior as espículas são mais curtas e apresentam progressivamente um menor número de digitações (Fig. 31 C), desaparecendo do bordo posterior do corpo junto ao poro excretor.

A ventosa oral é subventral, e está rodeada de numerosos órgãos sensoriais papilares, nos quais se destaca um orifício central por onde sai o cílio sensitivo (Fig. 31 D).

O acetábulo é constituído por duas ventosas ventrais, esféricas. No lábio é possível observar-se a presença de quatro papilas sensoriais uniciliadas, dispostas duas

a duas longitudinalmente na linha média, e opostas. Estas papilas também se encontram dispersas pela face ventral pré acetabular. Na região pós acetabular, observam-se inúmeras pregas tegumentares, muito provavelmente, resultantes da contração da musculatura corporal.

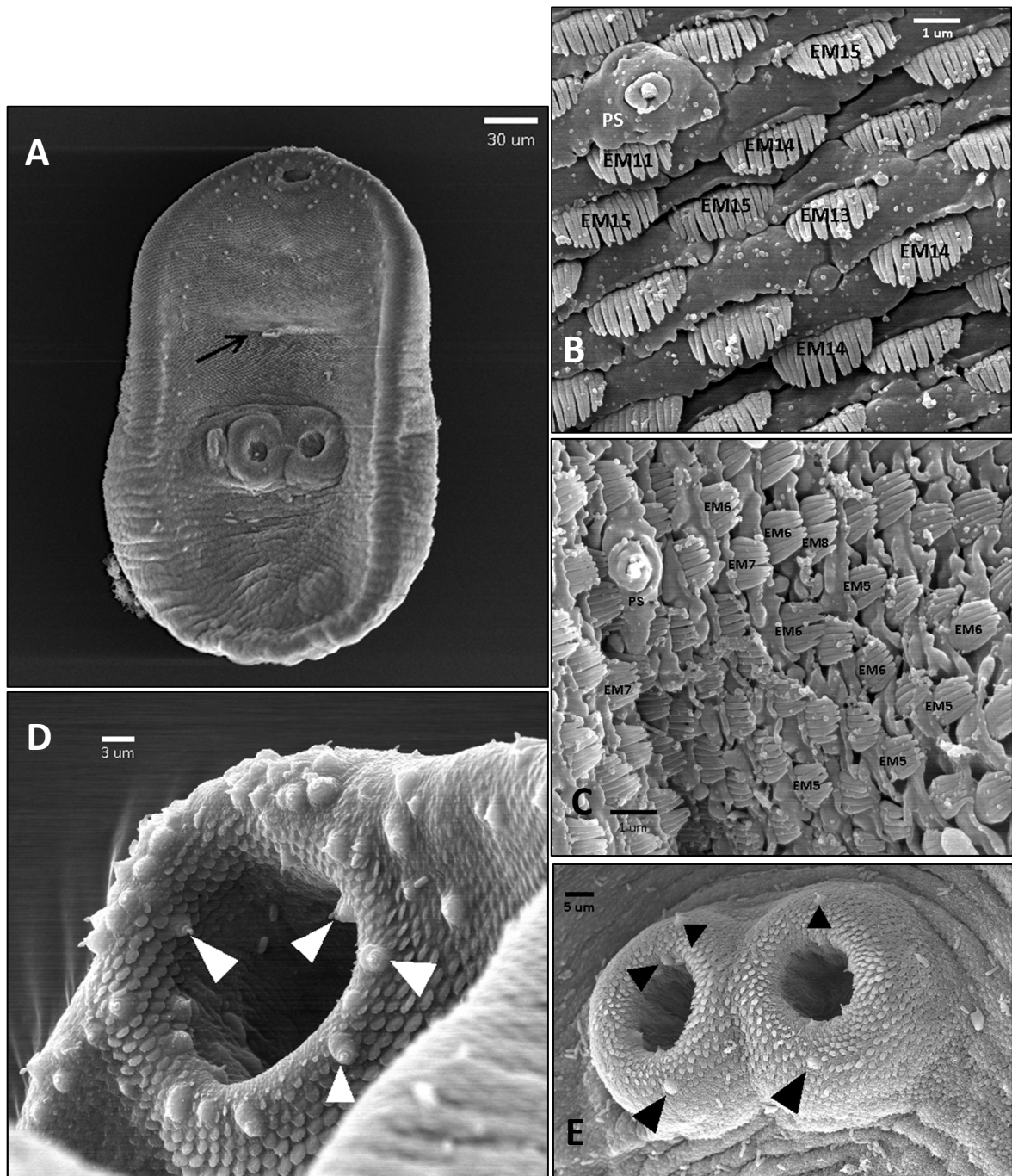


Fig. 31- Ultraestrutura de varrimento da metacercária encontrada no hepatopâncreas de *P. henslowii*. A- vista ventral, seta preta-depressão ventral transversal; B- tegumento dorsal anterior, PS- papila sensorial, EM- espículas multidentadas (nº de projeções); C- tegumento dorsal posterior, PS- papila sensorial, EM- espículas multidentadas (nº de projeções); D- ventosa oral, setas brancas- papilas sensoriais uniciliadas; E- acetábulo, setas pretas- papilas sensoriais uniciliadas

### 2.1.3. Caracterização molecular dos quistos

#### 2.1.3.1. Amplificação e Purificação da região ITS1 do rDNA

Depois de extraído o DNA dos quistos, procedeu-se à amplificação da região ITS1, tendo sido utilizados os *primers* A ITS1 Fw/A ITS1 Rev. Após submeter o produto a uma eletroforese em gel de agarose a 1%, verificou-se a presença de uma banda representada na Fig.32. O DNA extraído da banda foi purificado, e de forma a confirmar o tamanho do fragmento amplificado e quantificar o DNA, efetuou-se nova eletroforese em gel de agarose 1%. O produto purificado, com cerca de 950 pb, foi então enviado para sequenciação, de acordo com as especificações da empresa STABVIDA.

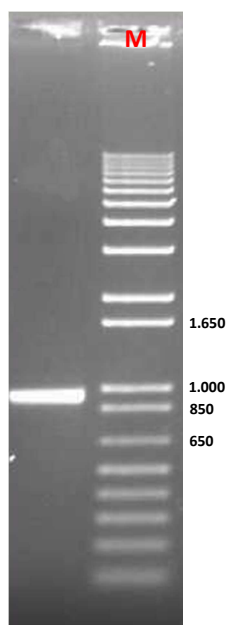


Fig. 32- Amplificação da região ITS1 do rDNA com os *primers* A ITS1 Fw/A ITS1 Rev. M- marcador de DNA

2.1.3.2. Sequenciação

As sequências obtidas foram cuidadosamente estudadas e alinhadas de forma a obter uma sequência ITS1 completa de 871 pb, como se pode verificar:

CGT CCC TGC CCT TTG TAC ACA CCG CCC GTC GCT ACT ACC GAT TGA ATG GTT AGC AAG GTC CTC GGA  
TCG GTA CCA TTG TAG TTG TCC CGG CAG CTC GAC CGG TGC TGA GAA GAC GAC CAA ACT TGA TCA TTT  
AGA GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG GTT TCC GTA GGT GAA CCT GCG GAA GGA TCA TTA CAG TAT TCC  
CTA ACC ATA CAA GCT TGG CTA TAT TGC CGA GTG TGT GTG CGG GTC GAC TTG CCT GCA ACA CAA ACC ATT  
GTG GCT TCG GCT GCC TGT GGT GAG ACC TGA ATG GTT CCG CCC GCC TCT TCC ATG GAT GTC CGC CTG  
TGC TGA AGC GCG TAG TTT CAG CCG GCT TCG GTC CCC TGC GGT CAT CTG TCT GTG ACG AAG CGC GCA  
GTT TCG TCC AAT CCC ATT GCG ACT TGC CTC GCT CCC CCC CAC GGT GGC GCC TGG GGG AAT GGT TAT TCT  
ATC ACC TTG GCT GTG CCT GGC TGC TCC AAG CGG CCT AAG CAC AGT CCT TCA TGT GTG GGG TGT CTA CCT  
GTC TCA TGC TCT CGG GGC GCT CGC GAT CAT TCG GTT GCC AGT TGA CTG CTG GGA GTG ACG GGG TGT  
GCT GCC AGT CGG GGT AGT GCT AGG CTT AAA GAG TGG TGT TCG GCT ACG GCC GAC CCA CCG CCC TGC  
TTG TTT GTT TTC CTA TAC AAT TTT ACA ACG TAC AAG TGG TTC GAT CCG GCT CAG TCG GTC GTT CCA CTG  
CCC AAT ATG CAC CTG GTG CCT CTG GCA CTG GAG TGC ATA TGC AGT CGC CCG TGT GTC TTG CCC CGG  
GTT GGA CTG ANA AAC TGT ACC TGG CTA TGC CAG GTA TAT GTG TAT AAC TCT GAT CGG TGG ATC ACT C

Comparação da Sequência no banco de dados Genbank

Da sequência alinhada, efetuou-se um *blast* no banco de dados, onde se obteve 100% de similaridade com sequência da espécie *Gynaecotyla longintestina* com o código GenBank: DQ118021.1 (Fig. 33).

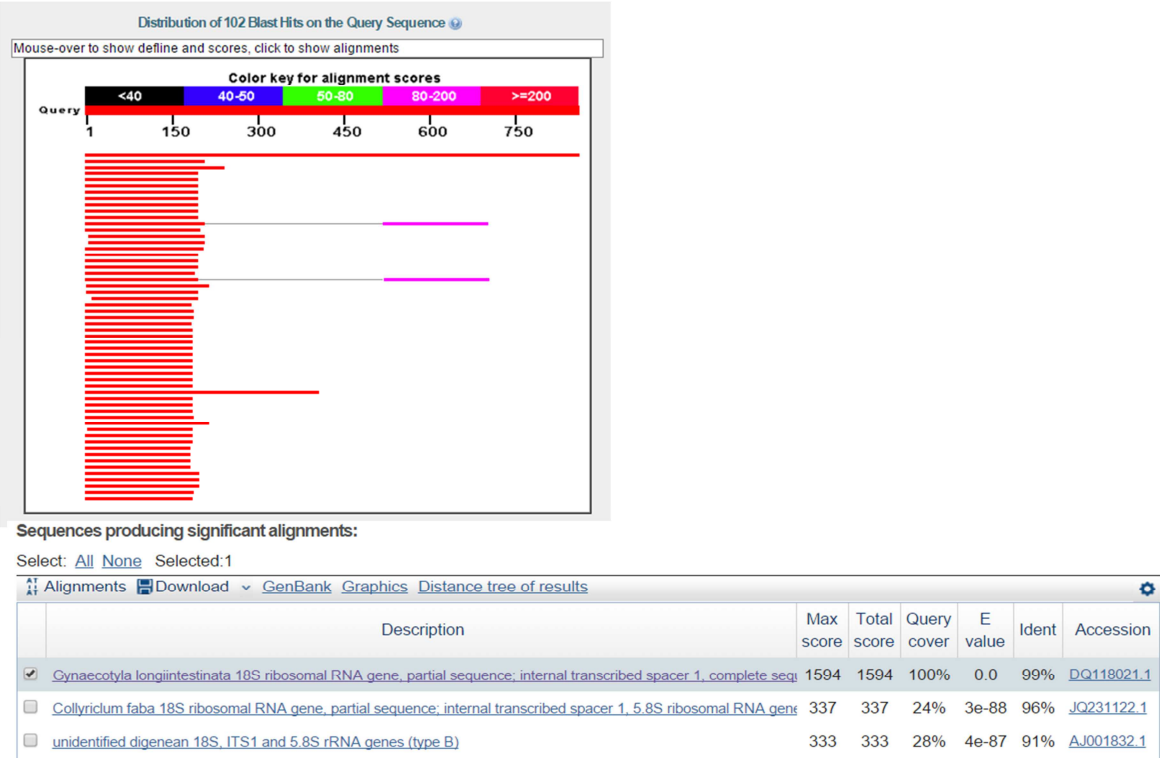


Fig. 33- Resultado do *blast* no banco de dados.

## 2.2. Caracterização morfológica, ultraestrutural e molecular dos quistos encontrados em *Carcinus maenas*

---

### 2.2.1. Descrição das metacercárias em microscopia ótica

Num total de 93 *Carcinus maenas* dissecados, 61 estavam parasitados. Os quistos, após observação à lupa binocular, apresentavam duas formas distintas, a forma oval medindo em média 471,16  $\mu\text{m}$  de comprimento e 365,07  $\mu\text{m}$  de largura, e a forma redonda, medindo em média 402,92  $\mu\text{m}$  de diâmetro. No entanto, e apesar da sua opacidade não permitir a visualização de muitas estruturas, sendo as glândulas vitelárias melhor identificadas, as características morfológicas de ambas as formas de quistos eram muito semelhantes. A parede do quisto era espessa, constituída por duas camadas, sendo a externa menos espessa que a interna (Fig.34).

A metacercária desenquistada é alongada e tem uma forma piriforme, medindo em média 927,63  $\mu\text{m}$ . Possui uma ventosa oral subterminal, uma pré-faringe, seguida de uma faringe ovoide e um esófago longo. Possui uma ventosa ventral circular, situada a 2/3 do comprimento total do corpo. Possui cecos digestivos divergentes, de forma arqueada, e terminam em cada um dos lados da ventosa ventral (Fig. 35 A, B).

Relativamente ao aparelho reprodutor masculino, o órgão copulatório é constituído por uma papila saliente, no interior da qual entra o canal ejaculador. Os testículos são simétricos, de forma irregular, sendo o esquerdo ligeiramente mais pequeno que o direito. A glândula prostática está localizada entre os cecos digestivos, acima da ventosa ventral, recobrimdo uma área considerável. Envolve a vesícula seminal, de forma ovoide e situada no lado direito, assim como o canal deferente (Fig.35 A).

Quanto ao aparelho genital feminino observa-se a presença de um ovário à direita e ao nível da ventosa ventral, e as glândulas vitelárias situadas posteriormente aos testículos (Fig.35 A).

O átrio genital envolve a papila masculina, prolonga-se à esquerda pela abertura do metratermo e, ventralmente, estabelece conexão com o poro genital, que se abre à esquerda nas proximidades da ventosa ventral (Fig.35 C).



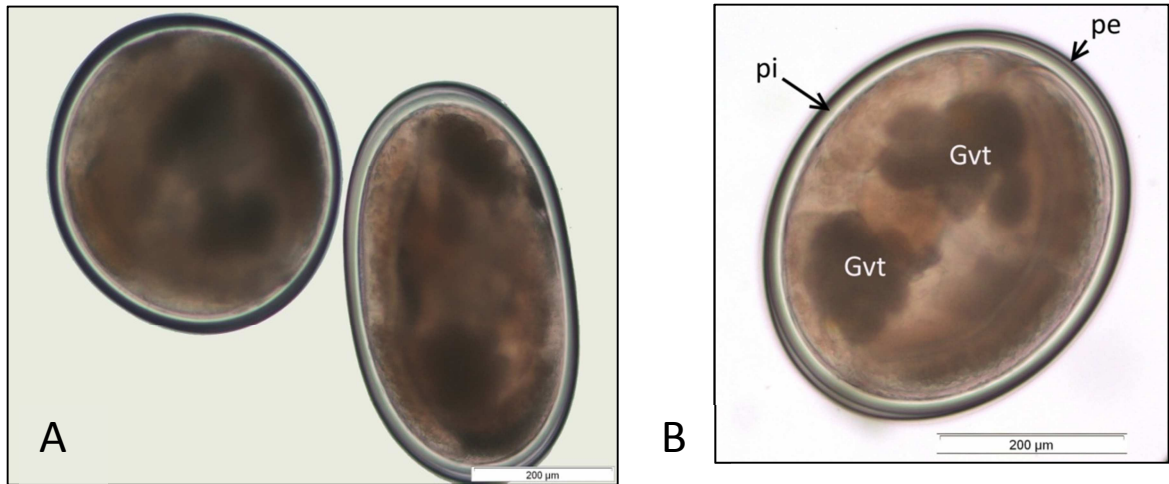


Fig. 34 A- Diferentes formas dos quistos isolados do hepatopâncreas de *C. maenas*; B- quisto isolado do hepatopâncreas de *C. maenas*; pe- parede externa; pi- parede interna; Gvt- glândulas vitelárias

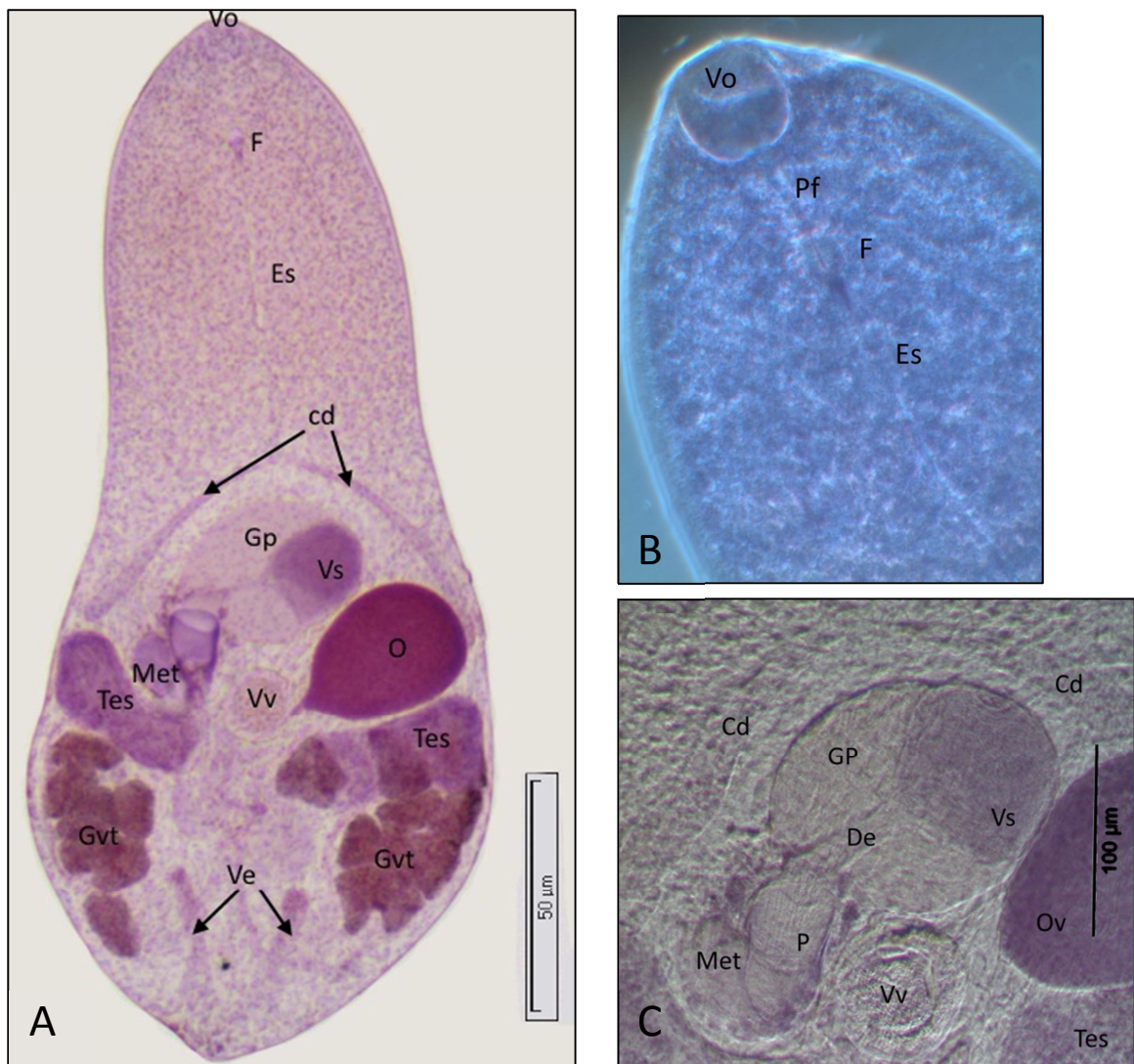


Fig. 35- Metacercárias desenquistadas bioquimicamente dos quistos de isolados de *C. maenas*; A- metacercária (vista dorsal); B- Metacercária, região cefálica; C- Metacercária, região posterior. Vo- ventosa oral; Pf- pré-faringe; F- faringe; Es- esôfago; cd- cecos digestivos; Gp- Glândula da próstata; Vs- vesícula seminal; De- Ducto ejaculatório; P- papila masculina; Met- metratermo; Vv- ventosa ventral; Ov- ovário; Tes- testículos; Gvt- Glândulas vitelárias; Ve- vesícula excretora.

### 2.2.2. Descrição das metacercárias em microscopia eletrônica de varrimento

As metacercárias desenquistadas dos quistos ovais e esféricos apresentam idêntica morfologia.

Como foi referido no ponto anterior, verifica-se que o corpo da metacercária é piriforme, com uma acentuada concavidade (Fig.36 A). A ventosa oral (Fig.36 E) é subventral, arredondada, com uma musculatura bem definida. Na sua face externa observam-se quatro papilas sensoriais uniciliadas, dispostas duas de cada lado. A ventosa ventral ou acetábulo, de forma circular, é um pouco maior que a ventosa oral (Fig. 36 F).

Observam-se numerosas papilas sensoriais, idênticas às que se encontram na ventosa oral, dispersas pelo corpo da metacercária, porém, em maior número na face ventral (Fig.36 C). Na região anterior, o tegumento está coberto por numerosas espículas, largas e em forma de concha, direcionadas para a região posterior, cada uma com cerca de 17 projeções digitadas, na margem distal. O tamanho destas espículas e número de projeções vai diminuindo à medida que se aproximam da parte final da região posterior, apresentando, nesta área, entre duas a quatro digitações, e por vezes apenas uma digitação (Fig.36 C, D). Observam-se inúmeras microvilosidades nas margens da região do corpo, e não se observam espículas (Fig.36 B). Não existem diferenças visíveis relativamente à morfologia do tegumento, entre a face dorsal e a face ventral da metacercária.



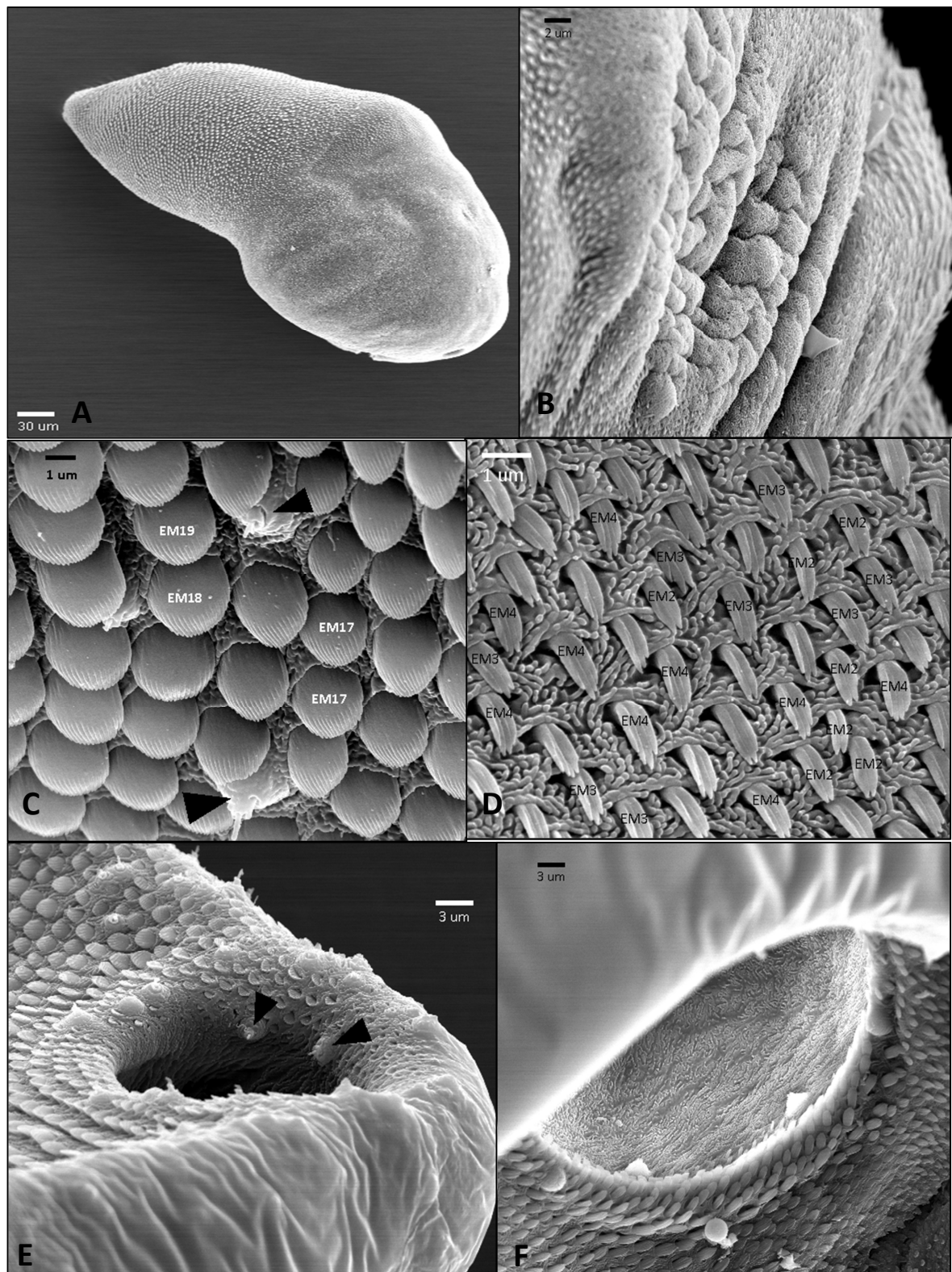


Fig. 36- Ultraestrutura de varrimento da metacercária extraída do hepatopâncreas de *C. maenas*; A- metacercária vista dorsal; B- tegumento da margem do corpo (região ventral posterior); C- tegumento dorsal anterior, setas pretas – papilas sensoriais unciliadas; D- tegumento dorsal posterior; E- ventosa oral, setas pretas – papilas sensoriais unciliadas; F- ventosa ventral



### 2.2.3. Caracterização molecular dos quistos

#### 2.2.3.1. Amplificação e Purificação da região ITS1 do rDNA

Depois de extraído o DNA de cerca de 50 quistos morfologicamente semelhantes ovais, e 50 quistos redondos, procedeu-se à amplificação da região ITS1 com os *primers* A ITS1 Fw/A ITS1 Rev, N ITS1 Fw/A ITS1 Rev, e N ITS1 Fw/N ITS1 Rev, 18S ITS1 Fw/A ITS1 Rev, 18S ITS1 Fw/5.8S ITS1 Rev, A ITS1 Fw/5.8S ITS1 Rev, N ITS1 Fw/5.8S ITS1 Rev.

Após várias tentativas, alterando a quantidade de DNA, misturas de *primers* e temperatura de annealing, obtiveram-se bandas com os *primers* N ITS1 Fw/A ITS1 Rev e A ITS1 Fw/A ITS1 Rev.

Os produtos resultantes da amplificação por PCR estão representados na Fig.37, após eletroforese em gel de agarose 1%. Depois de purificado o DNA amplificado com os *primers* anteriormente referidos, este foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1%, para confirmação do tamanho das bandas obtidas.

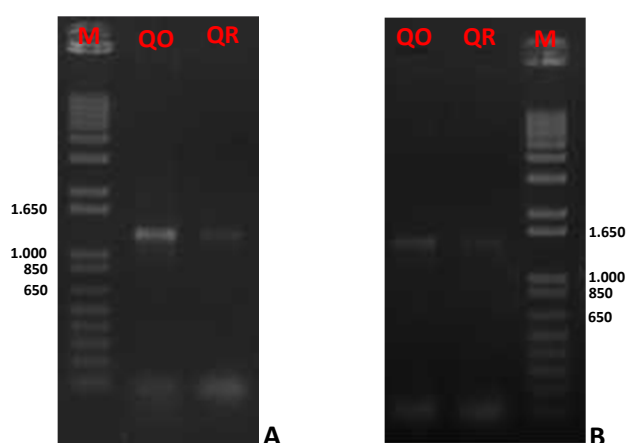


Fig. 37- Amplificação da região ITS1 do rDNA por PCR. A- bandas amplificadas com os *primers* N ITS1 Fw/A ITS1 Rev; B- bandas amplificadas com os *primers* A ITS1 Fw/A ITS1 Rev. QO- Quistos ovais; QR- Quistos redondos; M- DNA marcador.

Da amplificação com os *primers* N ITS1 Fw / A ITS1 Rev, foram obtidas bandas de, aproximadamente, 1250 pb (Fig. 37 A). Da amplificação com os *primers* A ITS1 Fw/A ITS1 Rev, foram obtidas bandas de, aproximadamente, 1450pb (Fig. 37 B).

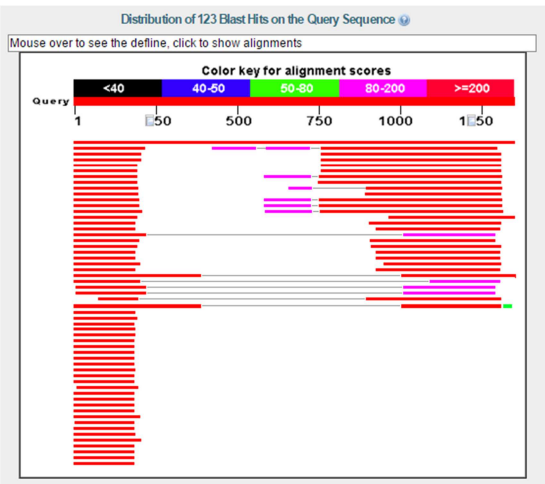
O DNA foi enviado para sequenciação direta, segundo as especificações da empresa STABVIDA.

2.2.3.2. Sequenciação

As sequências obtidas foram cuidadosamente estudadas e alinhadas, de forma a obter uma sequência ITS1 completa (1368pb). As bandas de DNA dos quistos ovais e redondos, apresentavam pesos semelhantes, e a sequenciação também se verificou ser a mesma.

GTC CCT GCC CTT TGT ACA CAC CGC CCG TCG CTA CTA CCG ATT GAA TGC TTT AGC AAG GTC ATC GGA TCG  
GTG CCA TTG TGG TTG CTT CGG CAG CTC GAC CGG TGC TGA GAA GAC GAC CGA ACT TGG TCA TTT AGA  
GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG GTT TCC GTA GGT GAA CCT GCG GAA GGA TCA TTA CAG TAT TCC CAA  
AAA TCA AAA CTC GGC GTA GCT GAG TTT CCC ATG TGT CGG CTT TTC GTC ATG GGT CTA ATG TAA GTG TCC  
GCC TGT GGT GAA GCG CTG TTC AGT TTC ACC CGG ACC GAT GCT TGT CTG CCT TAG GTA GAG CGC GTA  
GTT CTA CCC GGT CTC TCT TGT GGT CAC TTG CCT CGG TCG GAG CGT GCA GTT CCG TCC AAT CAG TAT CGA  
GCA TTT GCC AAA CTC AAT GTG GGT GTG CCG CCT GTG GTG AAG CGC TGT TCA GTT TCA CCC GGA CCG  
ATG CAG CTA GTC TGC CTT GAG TAG AGC GCG TAG TTC TAC CCG GTC TCC CCT GTG GTC ACT TGC TTT GGT  
CGA AGC GCG CAG TTT CGT CCA ATC ATA ATC GAG CAT TTG CCG AAA TTA ATG TGG GTG TGC CGC CTG  
TGG TGA AGC GTT TGT TCA GTT TCA CCC GGA CCG ATG CAG CTA GTC TGC CTT GAG TAG AGC GCG TAG TTC  
TAC CCG GTC TCC CCT GTG GCC ATT TAC CTC GGT CGA AGC GCG CAG TTT CGT CCA ATC AGA ATC GAG  
CAT TTG CCG AAA TCA ATG TGG GTG TGC CGC CTG TGG TGA AGV GTT TGT TCA GTT TCA CCC GGA CCG ATG  
CAG CTA GTC TGC CTT GAG TAG AGC GCG TAG TTC TAC CCG GTC TCC CCT GTG GCC ACT TGC TAG GAT  
AAG AGC GCG TAG TTC TGT CCA ATC AGG GTT GAG TTT GCT CTT CCC ACT CCC TTG TGG TGA GCA CAG CGC  
AGG GGG AAA TAT TGT CCA ATC AGA ATC AGG TCA TGC CCG GCT CCT TTG TGG GCC CAC GCA CAG TCC  
TTT GTG AGC GGG GTG TCT AAC CGT CTG ATG CTC TCG GTG TGC TTG CCG TTT ACG AAC TGC CAG TCT CAT  
TGG GGG TGA CCG TTG TTC TGC CAA TGG GCA GTG CTA GAC TCA ATG AGT AGT GCT TGT ATG GGC TAC  
GGC CGG CCT ACC GCC CCG TTT GTT GTT TTC AAA CTG TAT TAC ACT GTT GAA GTG GTG CAA GTC AGC TTG  
CTG GCC TGT TCC ATT GCC TCA ACA TGC ACC TGG TCT TGT ACT GGA ATG CAT GTG CCG TCG CCT GGA GGT  
GCC TTA TCC CGG GCT GGA CTG AGA ACC AAA ACC TCG GGT TTT ACT CGA GTT ACG TAC AAC TCT GAT  
CGG TGG ATC ACT CGG CTC GTG

Comparação da Sequência no banco de dados Genbank



Da sequência alinhada, efetuou-se um *blast* no banco de dados, onde se obteve 100% de similaridade com sequência da espécie *Microphallus primas* com o código GenBank: HM001303.1

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 1

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Microphallus primas 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complete sequence</a>	2488	4776	100%	0.0	99%	<a href="#">HM001303.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Microphallus abortivus isolate Mabo internal transcribed spacer 1, partial sequence</a>	891	1240	60%	0.0	96%	<a href="#">HM584159.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Microphallus similis isolate Mis internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	409	409	40%	9e-110	80%	<a href="#">HM584155.1</a>

Fig. 38- Resultado do *blast* no banco de dados

### 3. Análise dos gastrópodes amostrados

Dos 46 *N. reticulatus* colhidos na estação 1 da Ria de Aveiro, apenas 12 emitiram cercárias idênticas morfológicamente, tendo então como prevalência de infecção de 26%.

#### 3.1. Caracterização morfológica, ultraestrutural e molecular da fase larvar de cercária, encontrada em *Nassarius reticulatus*

##### 3.1.1. Descrição das cercárias em microscopia ótica

Quando observadas, à lupa binocular, as cercárias emitidas pelo gastrópode apresentavam movimentos giratórios. Ao microscópio ótico, possuem um corpo alongado e cónico, uma ventosa oral redonda e em posição subventral, uma pré-faringe pequena, mas visível, seguida de uma faringe oval e bem desenvolvida. Observam-se duas manchas oculares, escuras, de cada um dos lados da faringe (Fig. 39). Observam-se os cecos digestivos divergentes, que terminam na zona posterior da cercaria. Uma ventosa ventral circular está presente, sensivelmente na região média do corpo, e por trás dela estende-se um sistema excretor tubular, que termina na vesícula excretora de forma arredondada e em posição oblíqua. Os testículos, ainda em formação, situam-se abaixo da ventosa ventral. É possível observar também a presença de uma cauda longa, cerca de duas vezes o comprimento do corpo, mostrando pares de sedas em todo o seu comprimento (Fig. 40).



Fig. 39- Cercária emitida por *Nassarius reticulatus*. Vo- ventosa oral; Mo.- manchas oculares; F- faringe; cd- cecos digestivos; Vv- ventosa ventral; tp- testículos primitivos; v.ex- vesícula excretora



Fig. 40- Pormenor da cauda da cercária. Observação das sedas

### 3.1.2. Descrição das cercárias em microscopia eletrónica de varrimento

Em microscopia eletrónica de varrimento observa-se um corpo de forma cónica, ligeiramente achatado dorsoventralmente (Fig. 41 A, B). A ventosa oral é subventral, e está rodeada por numerosos órgãos sensoriais papilares, nos quais se destaca um orifício central por onde sai o cílio sensitivo (Fig. 41 C). A ventosa ventral, de forma circular, está rodeada por papilas sensoriais uniciliadas (Fig 41 D).

O tegumento, na face ventral e anterior, encontra-se revestido por espículas cuticulares bifurcadas, direcionadas para a região posterior. Distribuem-se até à borda posterior do acetábulo, e vão diminuindo progressivamente de tamanho e de digitações à medida que se aproximam da região posterior do corpo (Fig. 41 E, F).

A cauda é mais longa que o corpo e apresenta, em média, cerca de 26 pares de sedas ao longo de todo o comprimento (Fig 41 A, G, H).



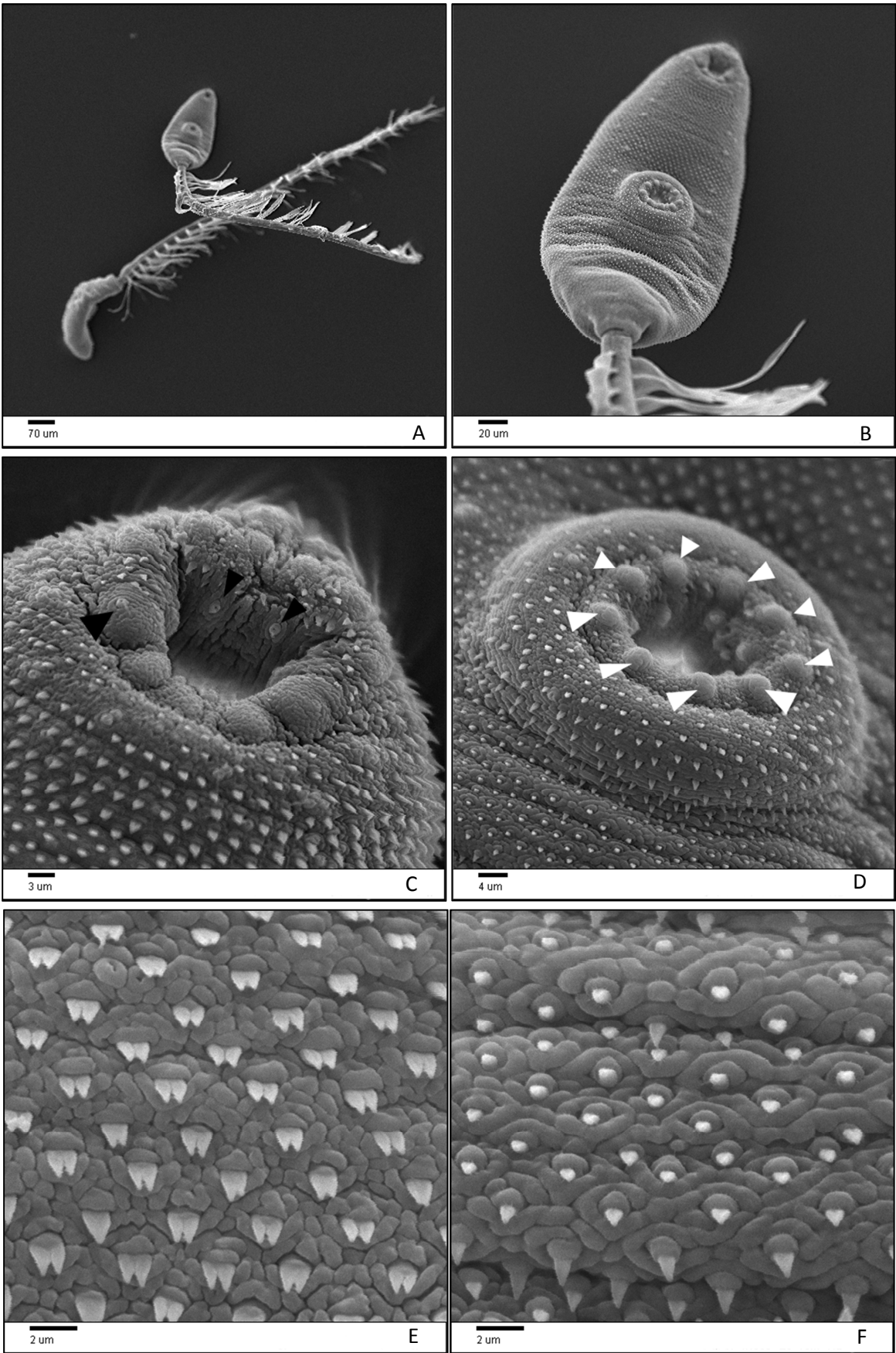


Fig. 41- Continua na página seguinte

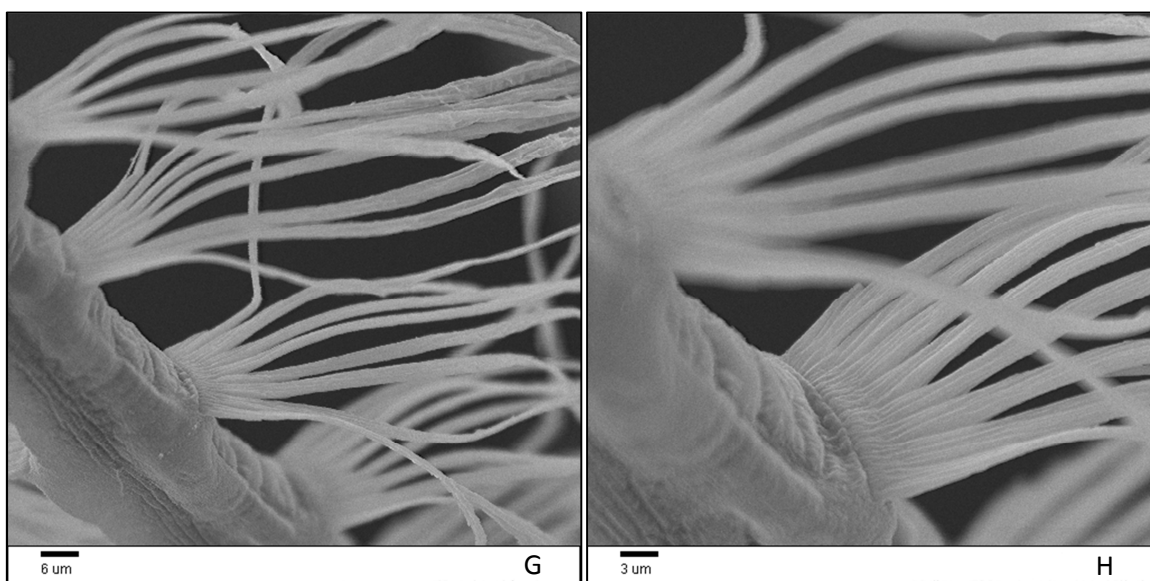


Fig. 41 – Ultraestrutura de varrimento da cercária emitida por *N. reticulatus*. A- cercária; B- corpo da cercária; C- ventosa oral; D- ventosa ventral; E- tegumento da região anterior; F- tegumento da região posterior; G e H- Pormenor das sedas da cauda. Setas brancas- papilas sensoriais; setas pretas- papilas sensoriais unciliadas.

### 3.1.3. Caracterização molecular das cercárias emitidas por *N. reticulatus*

#### 3.1.3.1. Amplificação e purificação da região ITS2 do rDNA

Depois de extraído o DNA de cerca de 50 cercárias, procedeu-se à amplificação da região ITS2 com os *primers* 5.8S ITS2 Fw/28S ITS2 Rev.

Os produtos resultantes da amplificação por PCR estão representados na Fig. 42, após eletroforese em gel de agarose 1%. Depois de purificado o DNA amplificado com os *primers* anteriormente referidos, este foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1%, para confirmação do tamanho das bandas obtidas.

Da amplificação foi obtida uma banda de, aproximadamente, 500 pb.

O DNA foi enviado para sequenciação direta, segundo as especificações da empresa STABVIDA.

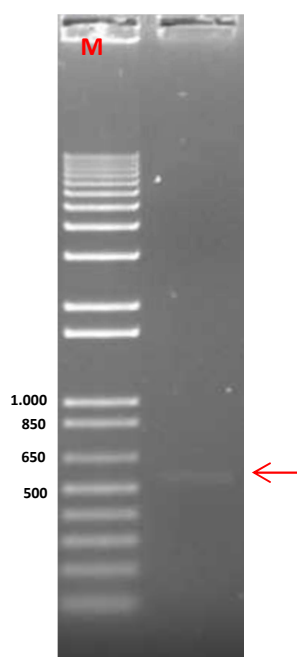


Fig. 42- Amplificação da região ITS2 do rDNA com os primers 5.8S ITS2 Fw/28S ITS2 Rev. M- marcador de DNA

### 3.1.3.2. Sequenciação

As sequências obtidas foram cuidadosamente estudadas e alinhadas, de forma a obter uma sequência ITS2 completa (442 pb).

```

ATA TGT GAC TGC ATA CTG CTT TGA ACA TCG ACA TCT TGA ACG CAT ATT GCG GCC ATG GGT TAG CCT GTG
GCC ACG CCT GTC CGA GGG TCG GCT TAT AAA CTA TCA CGA CGC CCA AAA AGT CGT GGC TTG AGT TTT
GCC AGC TGG CAT GAT TCC CCT ATC TGG TCT TGT ATC GGT GTG GGG TGC CAG ATC TAT GGC GTT TCT CCA
ATG TAT CCG ACG TAT CCA TAT CGT GGC AAG TTG CTT TGA TGC GGA TGC GGC GAC GGA GTC GTG GCT
CAA TTT TTG TTC TGC GCG CTC TGT TGC TGC GTT GCC TGT GTC TCG GTG ATA GCT ATG TGT GTG GCA ATG
CGT TGA TGT TTT ATA ACC GAT GTA CCA TTG GTA CTT CAT TTT CCT GAC CTC GGA TCA GAC GTG AAT ACC
CGC TGA ACT TAA GCA TAT CAC TAA GCG GAG GAA A
  
```

Comparação da Sequência no banco de dados Genbank

Da sequência alinhada, efetuou-se um *blast* no banco de dados, onde se obteve 100% de similaridade com sequência da espécie *Lepocreadium album*, com o código GenBank: KF656704.1 (Fig. 43)

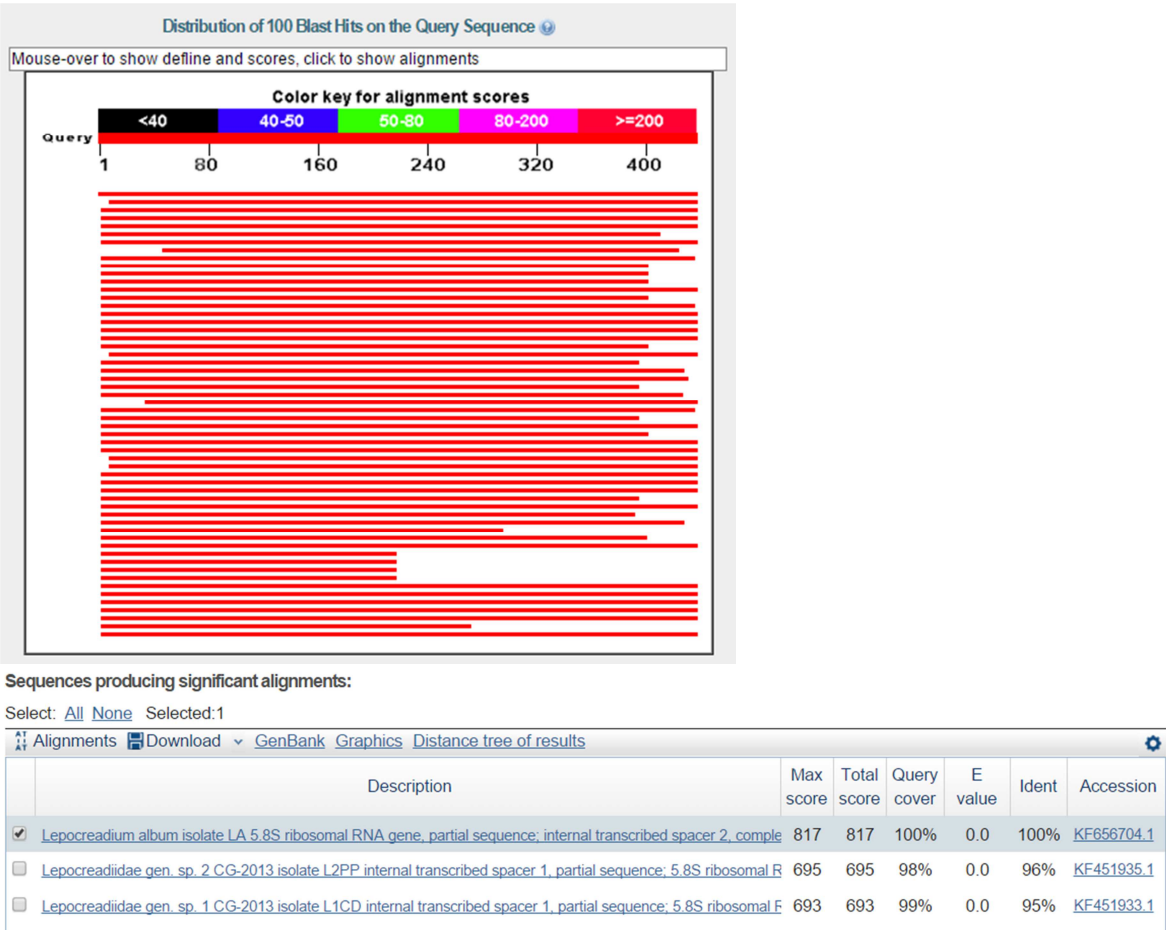


Fig. 43- Resultado do *blast* no banco de dados



## CAPÍTULO 4 – DISCUSSÃO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO

---

Tal como foi referido no capítulo 1, os parasitas trematódes digenéticos apresentam um ciclo de vida extremamente complexo, envolvendo dois a três hospedeiros e diferentes estádios larvares. De modo a conseguirem completar o seu ciclo de vida, muitas espécies de parasitas têm vindo a evoluir a capacidade de manipular a fisiologia ou comportamento dos seus hospedeiros intermediários, de forma a conseguir alcançar o hospedeiro seguinte (Moore et al., 1990). E por envolverem hospedeiros invertebrados e vertebrados, interferem com organismos de diferentes níveis da cadeia alimentar. Desta forma, a construção dos ciclos de vida destes parasitas são um passo importante para a compreensão da dinâmica populacional e da ecologia marinha. No passado, muitos ciclos de vida foram inferidos unicamente com base em observações morfológicas, pela deteção de similaridades entre as fases larvares e adultos. Os dados resultantes da microscopia são extremamente importantes, contudo podem não ser os mais corretos, pois algumas características usadas na descrição de inúmeras espécies podem ser subjetivas na visão de diferentes autores.

A biologia molecular veio dar um passo gigante na identificação das espécies, mas é também uma ferramenta fundamental para o estabelecimento de correspondências entre as diferentes fases larvares, permitindo estabelecer e clarificar os ciclos de vida dos Digenea. A sistemática também adotou estas técnicas, que constituem novas formas de deteção de diferenças e similaridades entre os taxa. Neste trabalho optou-se pelo uso das regiões ITS (ITS1 e ITS2) para a identificação das espécies. Esta região tem sido amplamente usada na identificação de espécies, devido a uma série de vantagens, entre as quais a facilidade de amplificação pelo uso de *primers* universais, e elevado nível de variação nas sequências, que ocorre mesmo entre espécies fortemente relacionadas. Para além disso, estão atualmente disponíveis na base de dados GenBank (PubMed), inúmeras sequências de trematódes digenéticos para comparação.

O objetivo deste trabalho foi o de pesquisar parasitas trematódes digenéticos em animais amostrados na Ria de Aveiro e, para isso, foram utilizados como modelos biológicos de estudo os crustáceos *Carcinus maenas* e *Polydora henslowii*, e o gastrópode *Nassarius reticulatus*.

Até ao momento, não foi encontrado nenhum trabalho descrito sobre digenéticos em *P. henslowii*, e visto este caranguejo, popularmente conhecido como “pilado”, pertencer à cadeia alimentar de vários vertebrados superiores, e ainda ser considerado um isco de grande qualidade para a arte da pesca, por exemplo para robalos e douradas, torna-se

um elo fundamental no ciclo de vida de vários digenéticos. Neste trabalho, foram encontradas metacercárias enquistadas nas glândulas antenais e hepatopâncreas deste caranguejo. A microscopia ótica (M.O.) e a microscopia eletrônica de varrimento (M.E.V.) vieram demonstrar que pertenciam todos à mesma espécie (Capítulo 3: Figs 29, 30, 31). Os dados obtidos através da morfologia, apontavam para a inclusão desta espécie na família Microphallidae, tais como corpo piriforme e com espinhos, presença de uma pré-faringe, faringe e esôfago; cecos digestivos curtos e divergentes, acetabulum situado na metade posterior do corpo; testículos simétricos e opostos, localizados em região pós acetabular, um ovário pré testicular, glândulas vitelárias em grupos opostos e simétricos e vesícula excretora em forma de V. Os resultados obtidos, quando comparados com trabalhos anteriores, levam-nos a afirmar que a espécie em questão é *Gynaecotyla adunca*, descrita por Pina et al. (2007) com o sinónimo *G. longiintestinata*. Os resultados obtidos através das técnicas de biologia molecular, com o recurso a consulta no banco de dados GenBank, vieram confirmar a espécie.

Em relação aos quistos extraídos de *Carcinus maenas*, pode-se verificar que, e apesar das diferenças de tamanho das metacercárias após o desenquistamento, a sua morfologia era idêntica, quer em M.O e M.E.V. (Cap3 Figs 35, 36). Os dados obtidos através da morfologia, também apontavam para a inclusão desta espécie na família Microphallidae, tal como a espécie encontrada em *P. henslowii*, mas com algumas diferenças. Através da comparação com trabalhos publicados anteriormente, também nos levou a afirmar que a espécie em questão é *Microphallus primas* (Pina et al., 2011). Este resultado confirmou-se através da análise molecular, novamente com recurso ao banco de dados GenBank.

Em *C. maenas*, podemos verificar que existe um microbiótomo mais suscetível à infeção por *M. primas*, porém não o único. Verifica-se que a prevalência de infestação é significativamente mais elevada no hepatopâncreas, em comparação com os restantes órgãos estudados.

As cercárias emitidas por *N. reticulatus*, (Cap.3 Fig 39, 40, 41), após análise morfológica por M.O. e M.E.V., verificou-se serem cercárias dístoma, pela presença de uma ventosa oral e uma ventosa ventral, tricocerca pela presença de sedas na cauda e oftalmocercaria pela presença das manchas oculares. Quanto à análise da biologia molecular, a região ITS1 não foi amplificada, após várias tentativas, tendo sido amplificada a região ITS2. Através da comparação da sequência obtida com o banco de dados GenBank, obteve-se uma sequência 100% similar, pelo que se identificou a

cercária em questão, sendo da espécie *Lepocreadium album*, sinónimo de *Cercaria setifera* (Meurant, 1967).

Este trabalho contribuiu para uma aprendizagem acerca dos ciclos de vida destes parasitas, e a sua importância a nível ecológico, mas também uma aprendizagem de toda a metodologia aplicada.

É de salientar o facto de ser o primeiro trabalho a apresentar resultados positivos para tremátodes digenéticos em *Polybius henslowii*, o que constitui um elo de ligação entre vários hospedeiros, visto servir de alimento a vários invertebrados e vertebrados.

Seria interessante, numa perspetiva futura, o aumento da representatividade desta espécie, com o intuito de perceber se *P. henslowii* é hospedeiro intermediário de outras espécies de digenéticos. Também seria interessante utilizar pesquisas outros potenciais hospedeiros, a fim de clarificar os ciclos de vida dos parasitas encontrados, tanto na Ria de Aveiro, como noutros pontos da extensa costa Portuguesa.



- Barnard CJ, Behnke JM. 1990. Parasitic relationships. *In* Parasitism and host behaviour. London, Taylor and Francis.
- Bartoli P, Gibson DI. 1998. A new acanthocolpid cercaria (Digenea) from *Cantharus dorbignyi* (Prosobranchia) in the Western Mediterranean. *Syst Parasitol* 40: 175-184.
- Bartoli P, Jousson O, Russell-Pinto F. 2000. The life cycle of *Monorchis parvus* (Digenea: Monorchidae) demonstrated by developmental and molecular data. *J Parasitol*, 86: 479-489.
- Blair D, Campos A, Cummings MP, Laclette JP. 1996. Evolutionary biology of parasitic Platyhelminths: The role of molecular phylogenetics. *Parasitology Today*, 12: 66-71.
- Bush, A. O., Lafferty, K. D., Lotz, J. M., & Shostak, A. W.. 1997. Parasitology Meets Ecology on Its Own Terms: Margolis et al. Revisited. *The Journal of Parasitology*, 83(4), 575–583.
- Cheng TC. 1978. Digenea – Los Trematodos Digeneticos. *In* *Parasitologia General*, Editorial A.C., Madrid, p. 370-463.
- Clarke GL. 1954. *Elements of Ecology*. Vol. I. New York, John Wiley & Sons.
- Cribb TH. 1998. The diversity of the Digenea of Australian animals. *Int J Parasitol* 28: 899-911.
- Dias JM, Lopes JF, Dekeyser I. 1999. Hydrological characterisation of Ria de Aveiro, Portugal, in early summer. *Oceanologica Acta* 22: 473-485.
- Eiras JC. 1994. *Elementos de Ictioparasitologia*. Fundação Eng. António de Almeida, Porto, Portugal, 339 p.
- Fretter V, Graham A. 1994. *British prosobranch molluscs: their functional anatomy and ecology*. London, Ray Society.

- Fried B. 1997. An overview of the biology of trematodes. *In* Advances in trematode biology. B Fried and TK Graczyk (eds), CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, p. 1-30.
- Goater TM, Goater CP, Esch GW. 2014. Parasitism: the diversity and ecology of animal parasites. Cambridge University Press.
- Hechinger, RF. 2012. Faunal survey and identification key for the trematodes (Platyhelminthes: Digenea) infecting *Potamopyrgus antipodarum* (Gastropoda: Hydrobiidae) as first intermediate host. *Zootaxa* (3418): 1-27.
- Hickman CP, Roberts LS, Larson A, l'Anson H. 2004. Acelomate Bilateral Animals – Phylum Platyhelminthes. *In* Integrated Principles of Zoology (12<sup>th</sup> ed). The McGraw-Hill Companies Inc New York, London, p: 247-285.
- Hickman, CP, 2007. Animal diversity (4<sup>th</sup> ed). New York, Boston, McGraw-Hill Higher Education.
- Hickman, CP, Ober WC, Garrison CW. 2012. Animal diversity (6<sup>th</sup> ed), New York, McGraw-Hill.
- Irwin SWB, Mckerr G, Judge BC, Moran I. 1984. Studies on metacercarial excystment in *Himasthla leptosoma* (Trematoda: Echinostomatidae) and newly emerged metacercariae. *Int J Parasitol*, 14: 415-421.
- Lauckner G. 1987. Ecological effects of larval trematode infestation on littoral marine invertebrate populations. *Int J Parasitol* 17: 391-398.
- Magalhaes L, Felicio M, Gaspar MB, Quintino V, Rodrigues AM. 2014. Reproductive biology of *Polybius Henslowii* Leach, 1820 (Decapoda, Polybiidae): A Discard Species from the Northwestern Portuguese Beam Trawl Fishery. *Crustaceana* 87: 784-800.
- Martins, V. A., Dias, J.A., Laut, L.L.M., Silva, F.S., Miranda, P., Rubio, B., Fernández-Fernández, S., Bernabeu, A., Rey, D., Bruna Ferreira, B., Renó. R., Yamashita, C., , Clemente, I.M.M.M., Laut, V.M., Rodrigues, M.A.C., Frontalini, F., Mendonça-Filho, J.G. de, Bernardes, C. e Rocha, F.. 2013. Distribuição de elementos traço e avaliação de risco de toxicidade de sedimentos da Laguna de Aveiro (NW Portugal). *In* M. A. C.

- Rodrigues, S. D. Pereira & S. Bergarnaschi (eds.), Interações Homem - Meio nas zonas costeiras: Brasil / Portugal, pp.103-119, Ed. Corbã, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- Matthews BE. 1998. An introduction to parasitology. Cambridge, Cambridge University Press.
- Mehlhorn H. 2008. Encyclopedia of Parasitology (3<sup>rd</sup> ed), Springer, NY, 860 p.
- Meurant G. 1967. Advances in Marine Biology APL, Elsevier Science.
- Moore J, Gotelli N, Barnard C, Behnke J. 1990. A phylogenetic perspective on the evolution of altered host behaviours: A critical look at the manipulation hypothesis. Parasitism and host behaviour: 193-233.
- Muniz-Pereira LC, Arruda VS, Pinto RM. 2004. Confirmação da sinonímia de *Gynaecotyla jaegerskioeldi* (Travassos) (Digenea, Microphallidae) com *Gynaecotyla adunca* (Linton) (Digenea, Gynaecotylinae). Revista Brasileira de Zoologia 21: 801-804.
- Neves DP. 2005. Parasitologia humana (11<sup>th</sup> ed), São Paulo, Atheneu.
- Newmark PA, Alvarado AS. 2002. Not your father's planarian: a classic model enters the era of functional genomics. Nat Rev Genet 3(3): 210-219.
- Olson PD, Cribb TH, Tkach VV, Bray RA, Littlewood DTJ. 2003. Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). Int J Parasitol, 33: 733-755.
- Phalee AC, Wongsawad A, Rojanapaibul, Chai JY. 2015. Experimental life history and biological characteristics of *Fasciola gigantica* (Digenea: Fasciolidae). Korean J Parasitol 53: 59-64.
- Pina S, Russell-Pinto F, Rodrigues P. 2011. Description of *Maritrema portucalensis* sp nov (Digenea, Microphallidae) parasite of *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda) from Aveiro estuary, Northern Portugal. Acta Parasitologica 56: 377-384.

- Pina S, Russell-Pinto F, Rodrigues P. 2011. Morphological and molecular study of *Microphallus primas* (Digenea: Microphallidae) metacercaria, infecting the shore crab *Carcinus maenas* from northern Portugal. *Folia Parasitologica* 58: 48-54.
- Pina S, Tajdari J, Russell-Pinto F, Rodrigues P. 2009. Morphological and molecular studies on life cycle stages of *Diphtherostomum brusinae* (Digenea:Zoogonidae) from northern Portugal. *J Helminthol*, 83: 321-331.
- Pina SMR, Russell-Pinto F, Rodrigues P. 2007. Clarification of *Cercaria sevilla* (Digenea: Microphallidae) life cycle using morphological and molecular data. *J Parasitol* 93: 318-322.
- Poulin R. 2010. Parasite manipulation of host behavior: An update and frequently asked questions. *Advances in the Study of Behavior* 41: 151-186.
- Poulin R, Chappell LH. 2002. *Parasites in Marine Systems*, Cambridge University Press.
- Rato M, Ferreira N, Santos J, Barroso C. 2009. Temporal evolution of imposex in *Nassarius reticulatus* (L.) along the Portuguese coast: the efficacy of EC regulation 782/2003. *J Environ Monit* 11: 100-107.
- Rato M, Russel-Pinto F, Barroso C. 2009. Assessment of Digenean Parasitism in *Nassarius Reticulatus* (L.) along the Portuguese coast: Evaluation of Possible Impacts on Reproduction and Imposex Expression." *Journal of Parasitology* 95: 327-336.
- Ruppert EE, Barnes RD. 1994. Platyhelminthes, Gnathostomulids and Mesozoans – Class Trematoda. *In Invertebrate Zoology* (6<sup>th</sup> ed). Saunders College Publishing, London, New York, Tokyo, p. 240-246.
- Russell-Pinto F, Bartoli P. 2002. *Cercaria sevilla* n. sp., a new cercaria (Digenea : Microphallidae) from *Nassarius reticulatus* (L.) (Mollusca: Prosobranchia) in Portugal. *Syst Parasitol*, 53: 175-182.
- Russell-Pinto F, Gonçalves JF, Bowers E. 2006. Digenean larvae parasitizing *Cerastoderma edule* (Bivalvia) and *Nassarius reticulatus* (Gastropoda) from Ria de Aveiro, Portugal. *J Parasitol* 92: 319-332.



Smyth JD, Wakelin D. 1994. Introduction to animal parasitology. Cambridge, Cambridge University Press.

Storer TI, Usinger RL, Stebbins RC, Nybakken JW. 1982. Zoología General (6<sup>th</sup> ed). Omega S.A. (eds), Barcelona, 955 p.

Toledo R, Fried B. 2014. Digenetic trematodes. New York, NY, Springer.

## Links

[http:// prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html](http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>

<http://camarinha.aveiro-digital.net/ria001.html>

<http://www.stabvida.com/>

<http://www.marinespecies.org/>

[http://www.pttrip.pt/centro/conteudos/a-ria-de-aveiro-a-veneza-portuguesa-\\_656](http://www.pttrip.pt/centro/conteudos/a-ria-de-aveiro-a-veneza-portuguesa-_656)



## ANEXO 1



Tabela - Listagem detalhada do número de metacercárias encontradas nos órgãos dissecados em *P. henslowii* e *C. maenas*.

Indivíduo	Espécie	Género	Cefalotorax (cm)	Brânquias	Gl. Antenal	Hepatopâncreas	Gónada
1	<i>P. henslowii</i>	♀	4,37	0	0	0	0
2	<i>P. henslowii</i>	♀	4,23	0	0	0	0
3	<i>P. henslowii</i>	♀	2,36	0	0	0	0
4	<i>P. henslowii</i>	♀	2,46	0	2	0	0
5	<i>P. henslowii</i>	♀	3,6	0	0	20	0
6	<i>P. henslowii</i>	♀	4	0	12	16	0
7	<i>P. henslowii</i>	♀	3,6	0	0	10	0
8	<i>P. henslowii</i>	♀	3,62	0	0	0	0
9	<i>P. henslowii</i>	♀	3,6	0	0	5	0
10	<i>P. henslowii</i>	♀	3,8	0	0	0	0
11	<i>P. henslowii</i>	♀	3,3	0	0	0	0
12	<i>P. henslowii</i>	♀	4,3	0	0	0	0
13	<i>P. henslowii</i>	♀	3,6	0	0	0	0
14	<i>P. henslowii</i>	♀	4	0	0	0	0
15	<i>P. henslowii</i>	♀	3,3	0	0	7	0
16	<i>P. henslowii</i>	♀	3,32	0	0	12	0
17	<i>P. henslowii</i>	♀	2,77	0	0	0	0
18	<i>P. henslowii</i>	♀	2,97	0	0	0	0
19	<i>P. henslowii</i>	♀	3,28	0	0	0	0
20	<i>P. henslowii</i>	♀	3,52	0	0	0	0
21	<i>C. maenas</i>	♀	2,69	2	4	6	2
22	<i>C. maenas</i>	♂	3,98	0	0	0	0
23	<i>C. maenas</i>	♀	2,73	0	0	0	0
24	<i>C. maenas</i>	♀	2,95	0	0	0	0
25	<i>C. maenas</i>	♂	3,13	0	0	0	0
26	<i>C. maenas</i>	♀	2,57	0	0	0	0
27	<i>C. maenas</i>	♂	5,39	0	0	12	0
28	<i>C. maenas</i>	♂	4,42	0	0	0	0
29	<i>C. maenas</i>	♂	5,13	0	20	100	0
30	<i>C. maenas</i>	♀	3,92	0	0	0	0
31	<i>C. maenas</i>	♀	4,01	0	0	26	0
32	<i>C. maenas</i>	♀	4,97	0	4	6	0
33	<i>C. maenas</i>	♀	4,23	0	0	10	0
34	<i>C. maenas</i>	♀	4,33	0	0	6	0
35	<i>C. maenas</i>	♀	3,79	0	0	0	0
36	<i>C. maenas</i>	♀	2,7	0	0	10	0
37	<i>C. maenas</i>	♀	2,48	0	0	5	0
38	<i>C. maenas</i>	♀	2,5	0	0	20	0
39	<i>C. maenas</i>	♀	2,79	0	0	5	0
40	<i>C. maenas</i>	♂	2,83	0	0	4	0
41	<i>C. maenas</i>	♂	3,19	0	0	0	0
42	<i>C. maenas</i>	♂	3,54	0	506	725	34

43	<i>C. maenas</i>	♂	2,97	0	0	86	0
44	<i>C. maenas</i>	♀	2,68	0	0	0	0
45	<i>C. maenas</i>	♀	3,38	0	0	150	0
46	<i>C. maenas</i>	♀	1,91	0	0	0	0
47	<i>C. maenas</i>	♀	3,4	0	0	5	0
48	<i>C. maenas</i>	♀	2,58	0	0	0	0
49	<i>C. maenas</i>	♀	2,87	0	0	0	0
50	<i>C. maenas</i>	♀	2,51	0	0	0	0
51	<i>C. maenas</i>	♂	2,91	0	0	0	0
52	<i>C. maenas</i>	♀	2,12	0	0	0	0
53	<i>C. maenas</i>	♂	2,91	0	0	0	0
54	<i>C. maenas</i>	♀	3,73	0	0	0	0
55	<i>C. maenas</i>	♀	3,22	0	0	0	0
56	<i>C. maenas</i>	♀	2,92	0	0	0	0
57	<i>C. maenas</i>	♀	3,39	0	52	148	0
58	<i>C. maenas</i>	♂	2,96	0	0	0	0
59	<i>C. maenas</i>	♀	2,43	0	0	0	0
60	<i>C. maenas</i>	♀	2,92	0	0	41	0
61	<i>C. maenas</i>	♀	2,94	0	0	0	0
62	<i>C. maenas</i>	♂	3,15	0	8	45	0
63	<i>C. maenas</i>	♀	2,98	0	0	0	0
64	<i>C. maenas</i>	♀	3,64	0	0	280	0
65	<i>C. maenas</i>	♂	2,11	0	0	0	0
66	<i>C. maenas</i>	♀	2,33	0	0	0	0
67	<i>C. maenas</i>	♂	4,5	0	0	11	0
68	<i>C. maenas</i>	♀	3,98	7	0	13	0
69	<i>C. maenas</i>	♂	4,25	0	32	53	0
70	<i>C. maenas</i>	♀	3,71	10	54	133	0
71	<i>C. maenas</i>	♀	3,93	0	593	467	0
72	<i>C. maenas</i>	♂	3,97	0	0	0	0
73	<i>C. maenas</i>	♂	3,85	0	14	18	0
74	<i>C. maenas</i>	♂	4,14	0	0	17	0
75	<i>C. maenas</i>	♀	4,46	0	0	3	0
76	<i>C. maenas</i>	♂	3,85	0	14	18	0
77	<i>C. maenas</i>	♀	4,26	0	0	55	0
78	<i>C. maenas</i>	♀	4,27	0	38	80	0
79	<i>C. maenas</i>	♂	3,6	0	0	18	0
80	<i>C. maenas</i>	♀	3,76	9	30	126	0
81	<i>C. maenas</i>	♀	3,94	0	0	0	0
82	<i>C. maenas</i>	♀	4,46	0	78	1888	0
83	<i>C. maenas</i>	♀	4,63	0	0	150	0
84	<i>C. maenas</i>	♂	4,11	0	0	250	0
85	<i>C. maenas</i>	♂	3,86	0	0	212	0
86	<i>C. maenas</i>	♀	3,67	0	0	273	0
87	<i>C. maenas</i>	♀	4,03	6	20	60	0
88	<i>C. maenas</i>	♂	3,96	0	0	0	0

89	<i>C. maenas</i>	♂	4,03	0	30	80	15
90	<i>C. maenas</i>	♀	3,99	0	0	5	0
91	<i>C. maenas</i>	♀	3,59	0	0	153	0
92	<i>C. maenas</i>	♀	3,49	1	0	115	0
93	<i>C. maenas</i>	♀	2,95	0	0	96	0
94	<i>C. maenas</i>	♀	3,49	0	0	130	0
95	<i>C. maenas</i>	♀	3,46	0	0	86	0
96	<i>C. maenas</i>	♀	3,23	0	0	32	0
97	<i>C. maenas</i>	♀	3,49	0	0	211	0
98	<i>C. maenas</i>	♀	3,35	0	0	352	0
99	<i>C. maenas</i>	♀	3,45	0	0	55	0
100	<i>C. maenas</i>	♀	3,46	0	0	391	0
101	<i>C. maenas</i>	♀	3,49	0	0	0	0
102	<i>C. maenas</i>	♀	3,4	1	0	75	0
103	<i>C. maenas</i>	♀	3,49	0	0	141	0
104	<i>C. maenas</i>	♀	3,49	0	0	0	0
105	<i>C. maenas</i>	♀	2,33	0	0	346	0
106	<i>C. maenas</i>	♀	3,42	0	0	15	0
107	<i>C. maenas</i>	♀	3,46	0	0	401	0
108	<i>C. maenas</i>	♀	3,49	0	2	0	0
109	<i>C. maenas</i>	♀	2,95	0	0	0	0
110	<i>C. maenas</i>	♀	3,45	24	10	835	0
111	<i>C. maenas</i>	♀	3,46	0	5	294	0
112	<i>C. maenas</i>	♀	3,44	2	24	638	0
113	<i>C. maenas</i>	♀	3,41	0	7	13	0